

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 896 493**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 27/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013** **E 18184973 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021** **EP 3495387**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-ANG-2 y su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares**

30 Prioridad:

**13.07.2012 EP 12176299**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.02.2022**

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)  
Wagistrasse 18  
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**DUERR, HARALD;  
HERTING, FRANK;  
KLEIN, CHRISTIAN;  
REGULA, JOERG THOMAS;  
RUETH, MATTHIAS y  
STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 896 493 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

Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-ANG-2 y su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares

La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción de la viscosidad de un anticuerpo (incluyendo un anticuerpo biespecífico) de la subclase IgG1 humana o IgG4 humana, para anticuerpos biespecíficos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF/VEGF-A) humano y contra la angiopoyetina-2 (ANG-2) humana, procedimientos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y usos de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

La angiogénesis está implicada en la patogenia de una variedad de trastornos que incluyen tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares tales como retinopatías proliferativas o degeneración macular senil (DMS), artritis reumatoide y psoriasis (Folkman, J. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M. et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; y Garner, A., Vascular diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A. y Klintworth, G. K. (eds.), 2.<sup>a</sup> edición, Marcel Dekker, Nueva York (1994), pp. 1625-1710).

Ranibizumab (nombre comercial Lucentis®) es un fragmento de anticuerpo monoclonal derivado del mismo anticuerpo murino original que bevacizumab (Avastin). Sin embargo, ha madurado en afinidad para proporcionar una unión más fuerte a VEGF-A (documento WO 98/45331). Se conoce que el bloqueo de VEGF-A puede estar relacionado con algunas toxicidades sistémicas, por lo que al ranibizumab le falta una parte Fc para reducir la semivida en suero y, en consecuencia, las toxicidades sistémicas. Es un agente antiangiogénico que ha sido aprobado para tratar el tipo "húmedo" de la degeneración macular senil (DMS), una forma común de pérdida de visión senil.

Los ensayos de angiogénesis corneal han demostrado que tanto ANG-1 como ANG-2 tenían efectos similares, actuando sinérgicamente con VEGF para promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. La posibilidad de que hubiera una respuesta endotelial dependiente de la dosis se planteó por la observación de que, in vitro y a alta concentración, la ANG-2 también puede ser proangiogénica (Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52). A alta concentración, ANG-2 actúa como un factor de supervivencia de la apoptosis para las células endoteliales durante la apoptosis por privación de suero a través de la activación de Tie2 por medio de la vía de la PI-3 cinasa y Akt (Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52).

Los documentos WO 2010/040508 A9 y WO 2011/117329 se refieren a anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-ANG-2. El documento WO 2008/132568 se refiere a proteínas de fusión que se unen a factores de crecimiento. El documento WO 2009/136352 se refiere a compuestos anti-angiogénicos. Los documentos WO 2009/080253 y WO 2011/117330 se refieren a formatos de anticuerpos bivalentes biespecíficos. El documento WO 2010/069532 se refiere a anticuerpos contra Ang2.

Las enfermedades vasculares oculares, tales como la degeneración macular senil (DMS) y la retinopatía diabética (RD), se deben a una neovascularización coroidea o retiniana anómala, respectivamente. Son las principales causas de pérdida de visión en los países industrializados. Dado que la retina consiste en capas bien definidas de elementos neuronales, gliales y vasculares, los trastornos relativamente pequeños, tales como los observados en la proliferación vascular o el edema, pueden dar lugar a una pérdida significativa de la función visual. Las degeneraciones retinianas hereditarias, tal como la retinosis pigmentaria (RP), también se asocian con anomalías vasculares, tales como el estrechamiento arteriolar y la atrofia vascular. Afectan a hasta 1 de cada 3500 individuos y se caracterizan por ceguera nocturna progresiva, pérdida de campo visual, atrofia del nervio óptico, atenuación arteriolar y pérdida central de la visión que a menudo progresa hasta la ceguera completa.

Las retinopatías isquémicas se caracterizan por la pérdida o disfunción de la vasculatura de la retina que da como resultado una reducción del flujo sanguíneo e hipoxia. La retina responde a la hipoxia generando señales para que crezcan nuevos vasos sanguíneos, pero estos nuevos vasos normalmente son frágiles y desorganizados. Es el crecimiento de estos nuevos vasos anómalos lo que crea la mayor parte de la amenaza para la visión, ya que pueden filtrar, producir una hemorragia o dar lugar a cicatrices que pueden terminar en desprendimiento de retina. Los tratamientos actuales para las retinopatías isquémicas buscan detener el crecimiento de los vasos patológicos, pero no abordan la isquemia subyacente que impulsa su crecimiento. Además, el tratamiento estándar para la retinopatía diabética, una retinopatía isquémica que afecta a millones de personas, implica la destrucción de una parte de la retina con un láser para intentar detener el crecimiento de nuevos vasos y preservar la visión central. Se han empleado estrategias para bloquear la función del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un importante promotor del crecimiento de los vasos. A corto plazo, el tratamiento anti-VEGF puede mejorar la visión, pero no aborda la isquemia subyacente y, de hecho, puede exacerbar esta afección, ya que inhibe el crecimiento de todos los vasos, incluyendo los colaterales beneficiosos.

También existe la seria preocupación de la exposición sistémica de estos fármacos en pacientes ancianos y/o diabéticos, donde se puede requerir el crecimiento de nuevos vasos en los cerebros, corazones o extremidades isquémicas.

Típicamente, para las enfermedades oculares por medio de la aplicación intravítrea, a menudo se usan fragmentos de anticuerpos más pequeños como Fab o Fab(2), ya que tienen una semivida en suero baja y el riesgo de toxicidad sistémica es menor. Sin embargo, estos fragmentos más pequeños típicamente también tienen menores semividas intravítreas (por ejemplo, debido a la difusión más rápida en el suero) y se tienen que dosificar en general más a menudo.

Kim et al., Molecular Vision, 15 (2009) 2803-2812 se refiere a anticuerpos de longitud completa administrados por vía intravítrea en el ojo, en los que se había eliminado una IgG con unión a FcRn de la sangre de ratones naturales, mientras que no se había eliminado una IgY sin unión a FcRn de la sangre del sistema sanguíneo. Además, no se había eliminado la IgG con unión a FcRn del sistema sanguíneo en ratones con atenuación de FcRn.

Existe una necesidad en la técnica de mejores medios para tratar y prevenir diversas enfermedades vasculares oculares tales como las retinopatías isquémicas.

## Sumario de la invención

La invención proporciona un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad vascular ocular, en el que la enfermedad vascular ocular es retinopatía diabética, edema macular diabético, degeneración macular senil,

en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana,

en el que

i) dicho primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF comprende, en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3H de SEQ ID NO: 1, una región CDR2H de SEQ ID NO: 2 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 3 y, en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3L de SEQ ID NO: 4, una región CDR2L de SEQ ID NO: 5 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 6, y

ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 comprende, en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3H de SEQ ID NO: 9, una región CDR2H de SEQ ID NO: 10 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 11 y, en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3L de SEQ ID NO: 12, una región CDR2L de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 14, y en el que

iii) el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana derivada de origen humano y que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat.

En un modo de realización, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza por que la región constante de la cadena pesada de iii) es de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, dicho anticuerpo biespecífico de la subclase IgG1 se caracteriza por que la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG1 comprende además las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo biespecífico es bivalente y comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, de SEQ ID NO: 26, de SEQ ID NO: 27 y de SEQ ID NO: 28.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares, en la que las enfermedades vasculares oculares son retinopatía diabética, edema macular diabético o degeneración macular senil.

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico se administra por medio de aplicación intravítrea.

Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención tienen propiedades altamente valiosas debido a sus modificaciones específicas en la parte Fc/región constante que provocan un beneficio para un paciente que padece enfermedades vasculares oculares. Muestran una alta estabilidad en el entorno intravítreo y una lenta difusión desde el ojo (en comparación con los fragmentos de anticuerpos más pequeños sin una región constante de la cadena pesada), donde se localiza y trata la enfermedad real (por lo que, potencialmente, la pauta de tratamiento se puede mejorar en comparación con anticuerpos no de tipo IgG como, por ejemplo, fragmentos Fab y (Fab)2). Sorprendentemente, en comparación con los anticuerpos IgG no modificados, la

semivida en el ojo después de la aplicación intravítrea de los anticuerpos con las mutaciones I253A, H310A y H435A en la región constante (sin más unión a FcRn) fue similar (solo ligeramente reducida) (tablas 17a y 18a y figuras 7D y 7E), mientras que la difusión desde el ojo al suero sanguíneo fue similar (tabla 15 y figura 7B). Esto es altamente valioso, ya que se desea para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares relacionadas con ANG2 y/o VEGF para eliminar el VEGF y la Ang2 del ojo (por ejemplo, por medio del transporte al suero sanguíneo como complejo de anticuerpo anti-ANG2/ANG2 o complejo de anticuerpo anti-VEGF/VEGF). Por otra parte, los anticuerpos de acuerdo con la invención se eliminan bastante rápidamente del suero en comparación con los anticuerpos IgG no modificados (lo que es altamente deseable para reducir los posibles efectos secundarios derivados de la exposición sistémica).

Sorprendentemente, también muestran una menor viscosidad (véase la figura 2) (en comparación con las versiones sin las mutaciones I253A, H310A y H435A en la región constante) y, por lo tanto, son especialmente útiles para la aplicación intravítrea a través de agujas finas durante el tratamiento de enfermedades oculares (para dicha aplicación típicamente se usan agujas finas y la alta viscosidad hace que una aplicación apropiada sea bastante difícil). La menor viscosidad también permite formulaciones de mayor concentración.

También sorprendentemente, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención muestran una menor tendencia a la agregación (véase la figura 4) durante el almacenamiento (en comparación con las versiones sin las mutaciones I253A, H310A y H435A en la parte Fc) que es crítica para la aplicación intravítrea en el ojo (ya que una agregación en el ojo puede dar lugar a complicaciones durante dicho tratamiento). Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención muestran una buena eficacia en la inhibición de enfermedades vasculares.

En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos para su uso de acuerdo con la invención debido a sus modificaciones específicas en la región constante (por ejemplo, LALA P329G) muestran propiedades valiosas como la ausencia de unión a los receptores de Fc gamma, lo que reduce el riesgo de efectos secundarios como la trombosis y/o la muerte celular no deseada (debido a, por ejemplo, ADCC).

#### Descripción de las figuras

**Figura 1** Esquema de concepto y ventajas de anticuerpos IgG1 o IgG4 <VEGF-ANG-2> con mutaciones AAA (mutaciones I253A, H310A y H435A, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat)

**Figura 2** Medición de viscosidad basada en DLS a pequeña escala. Viscosidad extrapolada a 150 mg/ml en arginina/succinato 200 mM, pH 5,5 (comparación de anticuerpos <VEGF-ANG-2> de acuerdo con la invención VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA) con una referencia VEGFang2-0015 (sin dichas mutaciones AAA))

**Figura 3** Agregación por DLS dependiente de la temperatura (incluyendo la temperatura de comienzo de la agregación por DLS) en His 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 5 (comparación de anticuerpos <VEGF-ANG-2> de acuerdo con la invención VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA) con una referencia VEGFang2-0015 (sin dichas mutaciones AAA))

**Figura 4** Siete días de almacenamiento a 40 °C a 100 mg/ml (disminución del pico principal e incremento de peso molecular alto/PMA) (comparación de anticuerpos <VEGF-ANG-2> de acuerdo con la invención VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA) que mostraron una menor agregación con una referencia VEGFang2-0015 (sin dichas mutaciones AAA))

**Figura 5A** Afinidad por FcRn en estado estable de VEGFang2-0015 (sin mutaciones AAA): la superposición de sensogramas de Biacore a diferentes concentraciones muestra una unión dependiente de la concentración de VEGFang2-0015 (sin mutaciones AAA) a FcRn

**Figura 5B** Afinidad por FcRn en estado estable de A: VEGFang2-0015 (sin mutaciones AAA): la curva de respuesta de unión dependiente de la concentración de VEGFang2-0015 (sin mutaciones AAA) muestra unión a FcRn

**Figura 5C** Afinidad por FcRn en estado estable de VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA): la superposición de sensogramas de Biacore a diferentes concentraciones no muestra unión a FcRn a todas las concentraciones

**Figura 5D** Afinidad por FcRn en estado estable de VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA): la curva de respuesta de unión dependiente de la concentración de VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA) no muestra unión a FcRn

**Figura 5E** Afinidad por FcRn en estado estable de VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA): la curva de respuesta de unión dependiente de la concentración de VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA) no muestra unión a FcRn (el intervalo de respuesta de -0,6 a 0,2 RU/escala de concentración varía desde 0 a 0,35 M)

**Figura 6** Medición de la interacción FcgammaRIIIa de VEGFang2-0015 sin mutaciones AAA y VEGFang2-0016

con mutaciones AAA (ambos son subclase IgG1 con mutaciones LALA P329G; como control se usaron un anticuerpo anti-Dig de subclase IgG1 y un anticuerpo basado en IgG4)

**Figura 7A** Esquema del principio del ensayo ELISA farmacocinético (FC) para la determinación de concentraciones de anticuerpos biespecíficos <VEGF/Ang2> en suero y lisados oculares completos

**Figura 7B** Concentración sérica después de aplicación intravenosa: comparación de compuestos -VEGFang2-0015 sin mutaciones AAA y VEGFang2-0016 con mutaciones AAA

**Figura 7C** Concentración sérica después de aplicación intravítrea: comparación de compuestos -VEGFang2-0015 sin mutaciones AAA y VEGFang2-0016 con mutaciones AAA

**Figura 7D** Concentración en lisados oculares de VEGFang2-0016 (con mutación AAA) en el ojo derecho e izquierdo (después de la aplicación intravítrea solo en el ojo derecho en comparación con la aplicación intravenosa): solo se pudieron detectar concentraciones significativas en el ojo derecho después de la aplicación intravítrea. Después de la aplicación intravenosa, no se pudo detectar ninguna concentración en lisados oculares debido a la baja semivida sérica de VEGFang2-0016 (con mutación AAA)

**Figura 7E** Concentración en lisados oculares de VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) en el ojo derecho e izquierdo (después de la aplicación intravítrea solo en el ojo derecho en comparación con la aplicación intravenosa): se pudieron detectar concentraciones de VEGFang2-0015 en el ojo derecho (y hasta cierto punto en el ojo izquierdo) después de la aplicación intravítrea. Esto indica la difusión desde el ojo derecho al suero y desde allí al ojo izquierdo, lo que se puede explicar por la larga semivida de VEGFang2-0015 (sin mutación AAA). Después de la aplicación intravenosa, también se pudieron detectar concentraciones significativas en lisados oculares de ambos ojos debido a la difusión a los ojos del VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) estable en suero

#### Descripción detallada de la invención

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es bivalente.

En un aspecto de la invención, dicho anticuerpo biespecífico bivalente de acuerdo con la invención se caracteriza por comprender

a) la cadena pesada y la cadena ligera de un primer anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a VEGF;

b) la cadena pesada modificada y la cadena ligera modificada de un segundo anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a ANG-2, en el que los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

Este formato de anticuerpo biespecífico bivalente para el anticuerpo biespecífico que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano y a la angiopoyetina-2 (ANG-2) humana se describe en el documento WO 2009/080253 (incluyendo los dominios CH3 modificados "botón en ojal"). Los anticuerpos basados en este formato de anticuerpo biespecífico bivalente se denominan CrossMab.

En un modo de realización, dicho anticuerpo biespecífico bivalente se caracteriza por comprender

a) como cadena pesada del primer anticuerpo de longitud completa la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y como cadena ligera del primer anticuerpo de longitud completa la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, y

b) como cadena pesada modificada del segundo anticuerpo de longitud completa la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y como cadena ligera modificada del segundo anticuerpo de longitud completa la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

En consecuencia, un modo de realización de la invención es un anticuerpo biespecífico bivalente que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana, caracterizado por comprender las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, de SEQ ID NO: 26, de SEQ ID NO: 27 y de SEQ ID NO: 28.

En un modo de realización, los dominios CH3 del anticuerpo biespecífico bivalente de acuerdo con la invención se alteran por la tecnología "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, Ridgway J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621, y Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el

otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza los heterodímeros (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al. J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) e incrementa el rendimiento.

5 En un aspecto preferente de la invención, todos los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención se caracterizan por que

el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se encuentran cada uno en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo;

10 en el que dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo biespecífico, en el que la alteración se caracteriza por que:

a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada,

15 de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico,

se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada

y

25 b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada,

de modo que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico

30 se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro de la que se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

Por tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza preferentemente por que

35 el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa de a) y el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa de b) se encuentran cada uno en una interfase que comprende una alteración en la interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo;

en el que i) en el dominio CH3 de una cadena pesada

40 se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada

45 y en el que

ii) en el dominio CH3 de la otra cadena pesada

50 se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro de la que se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

Preferentemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

55 Preferentemente dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

60 En un aspecto de la invención, ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

65 En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la cadena "botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la cadena "ojal". También se puede usar un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681), por ejemplo, introduciendo una mutación Y349C en el dominio CH3 de la cadena

"botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la cadena "ojal".

En otro modo de realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3. En otro modo de realización preferente, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación E356C o S354C adicional en el otro dominio CH3 que forma un puente disulfuro intercatenario) (numeración siempre de acuerdo con el índice EU de Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Pero también se pueden usar de forma alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botón en ojal, como se describe por el documento EP 1 870 459 A1. Por tanto, otro ejemplo para el anticuerpo biespecífico son las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la cadena "botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la cadena "ojal" (numeración siempre de acuerdo con el índice EU de Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

En otro modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la cadena "botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la cadena "ojal" y, adicionalmente, las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la cadena "botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la cadena "ojal".

En otro modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y, adicionalmente, las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la cadena "botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la cadena "ojal".

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por tener una o más de las siguientes propiedades (determinadas en ensayos como se describe en el ejemplo 6

- muestra una concentración sérica menor en comparación con el anticuerpo biespecífico correspondiente sin las mutaciones descritas en iii) (96 horas después de la aplicación intravítrea en ratones, que son deficientes en FcRn de ratón, pero transgénicos hemicigóticos para FcRn humano);

- muestra una concentración similar (factor de 0,8 a 1,2) en lisados del ojo derecho completo en comparación con un anticuerpo biespecífico correspondiente sin las mutaciones descritas en iii) (en ratones, que son deficientes en FcRn de ratón, pero transgénicos hemicigóticos para FcRn humano, 96 horas después de la aplicación intravítrea en el ojo derecho).

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico bivalente se caracteriza por comprender

un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana, caracterizado por que

- i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende, como dominio variable de la cadena pesada (VH), la SEQ ID NO: 7 y, como dominio variable de la cadena ligera (VL), la SEQ ID NO: 8; y

- ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende, como dominio variable de la cadena pesada (VH), la SEQ ID NO: 15 y, como dominio variable de la cadena ligera (VL), la SEQ ID NO: 16; y

- iii) el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de la cadena pesada de subclase IgG1 o IgG4 (derivada de origen humano y) que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat)

y que tiene una o más de las siguientes propiedades (determinadas en ensayos como se describe en el ejemplo 6

- muestra una concentración sérica menor en comparación con el anticuerpo biespecífico correspondiente sin las mutaciones descritas en iii) (96 horas después de la aplicación intravítrea en ratones, que son deficientes en FcRn de ratón, pero transgénicos hemicigóticos para FcRn humano);

- muestra una concentración similar (factor de 0,8 a 1,2) en lisados del ojo derecho completo en comparación con un anticuerpo biespecífico correspondiente sin las mutaciones descritas en iii) (en ratones, que son deficientes en FcRn de ratón, pero transgénicos hemicigóticos para FcRn humano, 96 horas después de la aplicación intravítrea en el ojo derecho).

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por comprender un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana, caracterizado por que

i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende, como dominio variable de la cadena pesada (VH), la SEQ ID NO: 7 con 1, 2 o 3 sustituciones de residuos de aminoácido y, como dominio variable de la cadena ligera (VL), la SEQ ID NO: 8 con 1, 2 o 3 sustituciones de residuos de aminoácido; y

ii) el segundo sitio de unión a antígeno comprende, como dominio variable de la cadena pesada (VH), la SEQ ID NO: 15 con 1, 2 o 3 sustituciones de residuos de aminoácido y, como dominio variable de la cadena ligera (VL), la SEQ ID NO: con 1, 2 o 3 sustituciones de residuos de aminoácido; y

iii) el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de la cadena pesada de subclase IgG1 o IgG4 (derivada de origen humano y) que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat)

y que tiene una o más de las siguientes propiedades (determinadas en ensayos como se describe en el ejemplo 6

- muestra una concentración sérica menor en comparación con el anticuerpo biespecífico correspondiente sin las mutaciones descritas en iii) (96 horas después de la aplicación intravítrea en ratones, que son deficientes en FcRn de ratón, pero transgénicos hemicigóticos para FcRn humano);

- muestra una concentración similar (factor de 0,8 a 1,2) en lisados del ojo derecho completo en comparación con un anticuerpo biespecífico correspondiente sin las mutaciones descritas en iii) (en ratones, que son deficientes en FcRn de ratón, pero transgénicos hemicigóticos para FcRn humano, 96 horas después de la aplicación intravítrea en el ojo derecho).

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" se refiere a una proteína de unión que comprende sitios de unión a antígeno. Los términos "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno", como se usan en el presente documento, indican la región o regiones de una molécula de anticuerpo a la que se une realmente un ligando. El término "sitio de unión a antígeno" comprende dominios variables de la cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominios variables de la cadena ligera (VL) de anticuerpo (par de VH/VL.).

La especificidad de los anticuerpos se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo de un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos.

Los "anticuerpos biespecíficos" de acuerdo con la invención son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos de la presente invención son específicos para dos antígenos diferentes, VEGF como primer antígeno y ANG-2 como segundo antígeno.

El término anticuerpo "monoespecífico", como se usa en el presente documento, indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

El término "valente", como se usa en la presente solicitud, indica la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Como tales, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son preferentemente "bivalentes".

El término "VEGF", como se usa en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF/VEGF-A) humano, el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos (aminoácidos 27-191 de la secuencia precursora del VEGF165 humano: SEQ ID NO: 17; los aminoácidos 1-26 representan el péptido señal), y las isoformas del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares relacionadas 121, 189 y 206, como lo describen Leung, D.W. et al., Science 246 (1989) 1306-9; Houck et al., Mol. Endocrin 5 (1991) 1806-1814; Keck, P.J. et al., Science 246 (1989) 1309-12 y Connolly, D.T. et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24; conjuntamente con las formas alélicas y procesadas naturales de esos factores de crecimiento. VEGF participa en la regulación de la angiogénesis normal y anómala y en la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares (Ferrara, N. et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A. et al. J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F. et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F. et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J. et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; y Dvorak, H.F. et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039). VEGF es una glucoproteína homodimérica que se ha aislado de varias fuentes e incluye varias isoformas. VEGF muestra actividad mitógena altamente específica para las células endoteliales.

El término "ANG-2", como se usa en el presente documento, se refiere a angiopoyetina-2 (ANG-2) humana (de forma alternativa abreviada como ANGPT2 o ANG2) (SEQ ID NO: 18) que se describe, por ejemplo, en Maisonpierre, P.C. et al., *Science* 277 (1997) 55-60 y Cheung, A.H. et al., *Genomics* 48 (1998) 389-91. Las angiopoyetinas-1 (SEQ ID NO: 19) y -2 fueron descubiertas como ligandos para las Tie, una familia de tirosina cinasas que se expresan de manera selectiva dentro del endotelio vascular (Yancopoulos, G.D. et al., *Nature* 407 (2000) 242-48). Existen cuatro miembros definitivos de la familia de las angiopoyetinas. La angiopoyetina-3 y -4 (Ang-3 y Ang-4) puede representar contrapartes ampliamente divergentes del mismo locus de genes en ratones y hombres (Kim, I. et al., *FEBS Lett.* 443 (1999) 353-56; Kim, I. et al., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26523-28). ANG-1 y ANG-2 se identificaron originalmente en experimentos de cultivo de tejidos como agonista y antagonista, respectivamente (véase para ANG-1: Davis, S. et al., *Cell* 87 (1996) 1161-69; y para ANG-2: Maisonpierre, P.C. et al., *Science* 277 (1997) 55-60). Todas las angiopoyetinas conocidas se unen principalmente a Tie2 (SEQ ID NO: 20), y tanto Ang-1 como -2 se unen a Tie2 con una afinidad de 3 nM (Kd) (Maisonpierre, P.C. et al., *Science* 277 (1997) 55-60).

Los sitios de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico de la invención contienen seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en grados variables a la afinidad del sitio de unión por el antígeno. Existen tres CDR de dominio variable de la cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las CDR y las regiones estructurales (FR) se determina por comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en la que esas regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias.

Los anticuerpos de la invención comprenden regiones constantes de inmunoglobulina derivadas de origen humano de una o más clases de inmunoglobulinas, en las que dichas clases de inmunoglobulinas incluyen las clases IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgG e IgA, sus subclases, especialmente IgG1 e IgG4.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de aminoácidos única.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara normalmente por técnicas de ADN recombinante. Son preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación con la unión a C1q y/o unión al receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales y son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; el documento US 5.202.238 y el documento US 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que las regiones estructurales o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, una CDR murina se injerta en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véanse, por ejemplo, Riechmann, L. et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S. et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Las CDR en particular preferentes corresponden a las que representan secuencias que reconocen los antígenos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, en especial con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor de Fc (FcR).

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). También se pueden producir anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de estirpe germinal humana en dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). También se pueden producir

anticuerpos humanos en colecciones de presentación en fagos (Hoogenboom, H.R. y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole, A., et al. y Boerner, P., et al. están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., p. 77 (1985); y Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como se ha mencionado ya para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, también comprende dichos anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, en especial con respecto a la unión a C1q y/o la unión a FcR, por ejemplo, por "cambio de clase", es decir, por cambio o mutación de partes del Fc (por ejemplo, mutación de IgG1 a IgG4 y/o IgG1/IgG4).

El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes tienen regiones variables y constantes en forma reordenada. Los anticuerpos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática in vivo. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y se relacionan con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la estirpe germinal de anticuerpos humanos in vivo.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH), como se usa en el presente documento, indica cada uno del par de cadenas ligera y pesada que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de la  $\alpha$  y  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones estructurales y forman, conjuntamente con las CDR de la otra cadena, el sitio de unión a antígeno. Las regiones CDR3 de la cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel en particular importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por lo tanto, proporcionan otro objetivo de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a antígeno de un anticuerpo", cuando se usan en el presente documento, se refieren a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "estructurales" o "FR" son aquellas regiones del dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N al C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena se separan por dichos aminoácidos de región estructural. En especial, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión a antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Como se usa en el presente documento, el término "unión" o "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno (ya sea VEGF humano o ANG-2 humana) en un ensayo in vitro, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia con antígeno natural purificado. La afinidad de la unión se define por los términos  $k_a$  (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno),  $k_d$  (constante de disociación) y  $K_D$  ( $k_d/k_a$ ). En un modo de realización, unión o que se une específicamente quiere decir una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  mol/l o menos, en un modo de realización de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  mol/l.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico que se puede unir específicamente a un anticuerpo. En determinados modos de realización, el determinante epítipo incluye agrupamientos de moléculas químicamente activos en la superficie, tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, fosforilo o sulfonilo y, en determinados modos de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo.

En determinados modos de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que consiste en dos "cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa" y dos "cadenas ligeras de anticuerpo de longitud completa". Una "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en el sentido de N terminal a C terminal, en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena pesada 1 (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena

pesada 2 (CH2) de anticuerpo y un dominio constante de la cadena pesada 3 (CH3) de anticuerpo, abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3; y opcionalmente un dominio constante de la cadena pesada 4 (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. Preferentemente, la "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en el sentido de N terminal a C terminal, en VH, CH1, HR, CH2 y CH3.

Una "cadena ligera de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en el sentido de N terminal a C terminal, en un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviado como VL-CL. El dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo puede ser  $\kappa$  (kappa) o  $\lambda$  (lambda). Las dos cadenas de anticuerpo de longitud completa se unen por medio de enlaces disulfuro entre polipéptidos entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas de anticuerpos de longitud completa. Ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos son anticuerpos naturales como IgG (por ejemplo, IgG 1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención pueden ser de una sola especie, por ejemplo, humanos, o pueden ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención comprenden dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por un par de VH y VL, que se unen ambos específicamente al mismo antígeno. El extremo C de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido en el extremo C de dicha cadena pesada o ligera. El extremo N de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido en el extremo CN de dicha cadena pesada o ligera.

El término "conector peptídico", como se usa dentro de la invención, indica un péptido con secuencias de aminoácidos, que es preferentemente de origen sintético. Estos péptidos de acuerdo con la invención se usan para conectar el extremo C de la cadena ligera al extremo N de la cadena pesada del segundo anticuerpo de longitud completa (que se une específicamente a un segundo antígeno) por medio de un conector peptídico. El conector peptídico dentro de la cadena pesada y ligera del segundo anticuerpo de longitud completa es un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 30 aminoácidos, preferentemente con una longitud de 32 a 50 aminoácidos. En un el conector peptídico es un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de 32 a 40 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector es (GxS)<sub>n</sub>, con G = glicina, S = serina, (x = 3, n = 8, 9 o 10 y m = 0, 1, 2 o 3) o (x = 4 y n = 6, 7 u 8 y m = 0, 1, 2 o 3), preferentemente con x = 4, n = 6 o 7 y m = 0, 1, 2 o 3, más preferentemente con x = 4, n = 7 y m = 2. En un modo de realización, dicho conector es (G<sub>4</sub>S)<sub>6</sub>G<sub>2</sub>.

La expresión "región constante", como se usa en las solicitudes actuales, indica la suma de los dominios de un anticuerpo distintos de la región variable. La región constante no está implicada directamente en la unión de un antígeno, pero presenta diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las regiones constantes de la cadena ligera que se pueden encontrar en las cinco clases de anticuerpos se llaman  $\kappa$  (kappa) y  $\lambda$  (lambda).

Los términos "región constante derivada de origen humano" o "región constante humana", como se usan en la solicitud actual, indican una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de la cadena ligera kappa o lambda. Dichas regiones constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y, por ejemplo, se describen en Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (véase también, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788). Dentro de la solicitud, para la numeración de posiciones y mutaciones se usa el sistema de numeración EU (índice EU) de acuerdo con Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y se denomina "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat".

En un modo de realización, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención tienen una región constante de la subclase IgG1 humana (derivada de la subclase IgG1 humana).

En un modo de realización, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención tienen una región constante de la subclase IgG4 humana (derivada de la subclase IgG1 humana).

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana con mutaciones L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) y P329G (Pro329Gly). Dicho anticuerpo tiene una unión a FcR reducida (especialmente, no muestran más unión a FcR $\gamma$ 1, FcR $\gamma$ 2 y FcR $\gamma$ 3). Esto es especialmente útil para reducir los efectos secundarios potenciales como, por ejemplo, la trombosis (Meyer, T., et al., J. Thromb. Haemost. 7 (2009) 171-81). En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es de la subclase IgG4 humana con mutaciones S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) y P329G (Pro329Gly). Dicho anticuerpo muestra una unión a FcR reducida como se indica anteriormente. Mientras que la mutación Pro329Ala que ya se describió elimina solo dos tercios de la interacción tipo sándwich con Fc $\gamma$ RIIIa, la Pro329Gly en los anticuerpos de acuerdo con la invención transmite

completamente la unión de la parte Fc a FcγRIII. Esto es especialmente útil, ya que la unión a FcγRIII está involucrada en ADCC (toxicidad celular dependiente de anticuerpos) que da lugar a la muerte celular, que puede ser útil en el tratamiento de enfermedades cancerosas, pero que puede causar efectos secundarios graves en el tratamiento basado en anticuerpos de otras enfermedades vasculares o inmunológicas. Por tanto, los anticuerpos de acuerdo con la invención de la subclase IgG1 con mutaciones L234A, L235A y P329G y de la subclase IgG4 con mutaciones S228P, L235E y P329G son especialmente útiles, ya que ambos no muestran más unión a FcγRIII, FcγRIIIb y FcγRIIIc.

El término "con (las) mutaciones AAA", como se usa en el presente documento, se refiere a las mutaciones I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) y H435A (His435Ala) en la región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG4, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat.

El término "con (las) mutaciones LALA P329G", como se usa en el presente documento, se refiere a las mutaciones L234A (Leu234Ala), L235A (Leu234Ala) y P329G (Pro329Gly) en la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG1, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat. El término "con (las) mutaciones SPLE", como se usa en el presente documento, se refiere a las S228P (Ser228Pro) y L235E (Leu235Glu) la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG4, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat. El término "con (las) mutaciones SPLE y P329G", como se usa en el presente documento, se refiere a las S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) y P329G (Pro329Gly) la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG4, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat.

El anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención se produce preferentemente por medios recombinantes. Por tanto, un aspecto de la invención actual es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención y otro aspecto es una célula que comprende dicho ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Son conocidos ampliamente en el estado de la técnica procedimientos para la producción recombinante y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el aislamiento posterior del anticuerpo y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de anticuerpos como se ha mencionado anteriormente en una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas modificadas respectivas en vectores de expresión por procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucarióticas apropiadas, como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de E. coli, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Los procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

En el presente documento se divulga un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende las etapas de

- a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican dicho anticuerpo;
- b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

La etapa de recuperación en c incluye el uso de un reactivo de captura específico del dominio constante de la cadena ligera (que, por ejemplo, es específico para la cadena ligera constante kappa o lambda, dependiendo de si se usa una cadena ligera kappa o lambda en el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención). Este reactivo de captura específico de la cadena ligera se usa en un modo de unión y elución. Los ejemplos de dichos reactivos de captura específicos del dominio constante de la cadena ligera son, por ejemplo, KappaSelect™ y LambdaFabSelect™ de GE Healthcare/BAC, que se basan en una matriz de base de agarosa altamente rígida que permite altos caudales y baja contrapresión a gran escala. Contienen un ligando que se une a la región constante de la cadena ligera kappa o lambda, respectivamente (es decir, los fragmentos que carecen de la región constante de la cadena ligera no se unirán; figura 1). Por lo tanto, ambas se pueden unir a otras moléculas diana que contienen la región constante de la cadena ligera, por ejemplo, IgG, IgA e IgM. Los ligandos se unen a la matriz por medio de un largo brazo espaciador hidrófilo para que esté fácilmente disponible para unirse a la molécula diana. Se basan en un fragmento de anticuerpo monocatenario que se criba para detectar Ig kappa o lambda humana.

Los anticuerpos biespecíficos se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y el ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células

de hibridoma pueden servir como fuente de dichos ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células huésped tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes de secuencia de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo biespecífico se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Dichas modificaciones se pueden realizar, sin embargo, solo en un intervalo muy limitado. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpos mencionadas anteriormente tales como la subclase IgG y la unión a antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de proteínas o facilitar la purificación.

El término "célula huésped", como se usa en la solicitud actual, indica cualquier tipo de sistema celular que se pueda genomanipular para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización, se usan células HEK293 y células CHO como células huésped. Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y dichas designaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede que no sea precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula transformada originalmente.

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

Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión a ribosoma. Es conocido que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia precursora o secuencia líder secretora está enlazado de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una proteína precursora que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si está situado de modo que facilite la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra por fijación en sitios de restricción accesibles. Si dichos sitios no existen, se usan los conectores o adaptadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

La purificación de anticuerpos se realiza para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeo con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Los anticuerpos bivalentes biespecíficos para su uso de acuerdo con la invención muestran beneficios para pacientes humanos que necesiten un tratamiento dirigido a VEGF y ANG-2.

El anticuerpo biespecífico bivalente contra VEGF humano y ANG-2 humana de acuerdo con la invención actual puede tener un valioso perfil de eficacia/seguridad y puede proporcionar beneficios para un paciente que

necesite un tratamiento anti-VEGF y anti-ANG-2.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica para su uso que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, formulado conjuntamente con un vehículo farmacéutico.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéutico" incluye todos y cualquiera de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración administrada al sujeto por medio de una vía local. Por ejemplo, el anticuerpo o su composición se pueden administrar al sujeto mediante aplicación intraocular, por ejemplo, mediante inyección intraocular tal como inyección intravítrea. Esto se puede realizar de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76; Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206; y Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5.

Una composición de la presente invención se puede administrar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones tampón acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

Se pueden usar muchos modos posibles de administración, incluyendo, pero sin limitarse a, aplicación intraocular o aplicación tópica. En un modo de realización, la aplicación es intraocular e incluye, pero no se limita a, inyección subconjuntival, inyección intracanalicular, inyección en la cámara anterior por medio del limbo temporal, inyección intraestromal, inyección intracorneal, inyección subretiniana, inyección en el humor acuoso, inyección subtenoniana o dispositivo de administración mantenida, inyección intravítrea (por ejemplo, inyección vítrea anterior, media o posterior). En un modo de realización, la aplicación es tópica e incluye, pero no se limita a, colirio en la córnea.

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por medio de aplicación intravítrea, por ejemplo, por medio de inyección intravítrea. Esto se puede realizar de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76; Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206; y Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5.

En algunos modos de realización, los kits terapéuticos de la invención pueden contener una o más dosis de un anticuerpo biespecífico para su uso presente en una composición farmacéutica descrita en el presente documento, un dispositivo adecuado para la inyección intravítrea de la composición farmacéutica, y una instrucción que detalla los sujetos adecuados y los protocolos para llevar a cabo la inyección. En estos modos de realización, las composiciones se administran típicamente al sujeto que necesita tratamiento por medio de inyección intravítrea. Esto se puede realizar de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76; Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206; y Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5).

Las composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto por procedimientos de esterilización, supra, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, se puede producir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden variar los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares,

sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y anamnesis anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición sea administrable por jeringuilla. Además de agua, el vehículo es preferentemente una solución salina tamponada isotónica.

Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición.

La composición puede comprender una formulación oftálmica de liberación lenta que comprende un agente activo para administración subconjuntival. La formulación oftálmica de liberación lenta comprende micropartículas de agente activo esencialmente puro, por ejemplo, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. Las micropartículas que comprenden el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se pueden incrustar en un polímero farmacéuticamente aceptable biocompatible o un agente de encapsulación lipídica. Las formulaciones de liberación lenta se pueden adaptar para liberar todo de sustancialmente todo el material activo durante un periodo de tiempo prolongado. El polímero o matriz lipídica, si está presente, se puede adaptar para degradarse lo suficiente como para que se transporte desde el sitio de administración después de la liberación de todo o sustancialmente todo el agente activo. La formulación de liberación lenta puede ser una formulación líquida, que comprende un polímero farmacéuticamente aceptable y un agente activo disuelto o dispersado. Tras la inyección, el polímero forma un depósito en el sitio de las inyecciones, por ejemplo, mediante gelificación o precipitación.

Los términos "enfermedad vascular ocular" y "enfermedad vascular de los ojos" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento e incluyen retinopatía diabética, edema macular diabético y degeneración macular senil.

La degeneración macular es una afección médica que se encuentra predominantemente en adultos ancianos en los que el centro del revestimiento interno del ojo, conocido como área de la mácula de la retina, sufre afinamiento, atrofia y, en algunos casos, sangrado. Esto puede dar como resultado la pérdida de la visión central, lo que implica la incapacidad de ver detalles finos, leer o reconocer caras. De acuerdo con la Academia Americana de Oftalmología, es la causa principal de pérdida de visión central (ceguera) en los Estados Unidos hoy en día para las personas mayores de cincuenta años. Aunque algunas distrofias maculares que afectan a individuos más jóvenes a veces se denominan degeneración macular, el término se refiere en general a la degeneración macular senil (DMS).

La degeneración macular senil comienza con depósitos amarillos característicos en la mácula (área central de la retina que proporciona una visión central detallada, llamada fovea) llamados drusas entre el epitelio pigmentario de la retina y la coroides subyacente. La mayoría de las personas con estos cambios tempranos (denominados maculopatías seniles) tienen buena visión. Las personas con drusas pueden desarrollar DMS avanzada. El riesgo es considerablemente mayor cuando las drusas son grandes y numerosas y se asocian con alteraciones en la capa de células pigmentadas debajo de la mácula. Las drusas grandes y suaves están relacionadas con elevados depósitos de colesterol y pueden responder a los agentes reductores del colesterol o al procedimiento Rheo.

La DMS avanzada, que es responsable de la pérdida de visión profunda, tiene dos formas: seca y húmeda. La atrofia geográfica central, la forma seca de la DMS avanzada, resulta de la atrofia de la capa epitelial pigmentaria retiniana debajo de la retina, que causa pérdida de visión a través de la pérdida de fotorreceptores (bastoncillos y conos) en la parte central del ojo. Si bien no existe un tratamiento disponible para esta afección, el National Eye Institute y otros han demostrado que los suplementos vitamínicos con altas dosis de antioxidantes, luteína y zeaxantina ralentizan la progresión de la degeneración macular seca y, en algunos pacientes, mejoran la agudeza visual.

El edema macular se produce cuando se acumulan depósitos de líquido y proteína en o debajo de la mácula del ojo, un área central amarilla de la retina, que hace que se espese y se hinche. La hinchazón puede distorsionar la visión central de una persona, ya que la mácula está cerca del centro de la retina en la parte posterior del globo ocular. Esta área contiene conos bien empaquetados que proporcionan una visión central clara y nítida para que la persona pueda ver la forma, el color y los detalles que se encuentran directamente en la línea de visión. El edema macular quistoide es un tipo de edema macular que incluye la formación de quistes.

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales de experimentación tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como perros, gatos, ovejas, vacas, cerdos, conejos, pollos, etc. Los sujetos preferentes para poner en práctica los procedimientos terapéuticos de la presente invención son humanos. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen pacientes que ya padecen una enfermedad o trastorno vascular ocular, así como aquellos propensos a desarrollar el trastorno.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y dichas designaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede que no sea precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula transformada originalmente. Si se pretenden designaciones distintas, esto quedará claro a partir del contexto.

El término "transformación", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula huésped. Si se usan células sin barreras de pared celular extraordinarias como células huésped, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, por el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio como se describe por Graham, F.L., van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 546-467. Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se usan células procariotas o células que contienen construcciones de pared celular sustanciales, por ejemplo, un proceso de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio como se describe por Cohen, S.N., et al., PNAS. 69 (1972) 2110-2114.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el que un ácido nucleico se transcribe en ARNm y/o al proceso por el que el ARNm transcrito (también denominado transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan conjuntamente producto génico. Si el polinucleótido se deriva del ADN genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el empalme del ARNm.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autorreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones como se describe.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, se puede transcribir y traducir en un polipéptido. Un "sistema de expresión" se refiere normalmente a una célula huésped adecuada compuesta de un vector de expresión que puede funcionar para proporcionar un producto de expresión deseado.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.

#### Descripción del listado de secuencias (secuencias de aminoácidos)

SEQ ID NO:	1	CDR3H de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	2	CDR2H de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	3	CDR1H de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	4	CDR3L de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	5	CDR2L de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	6	CDR1L de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	7	dominio variable de la cadena pesada VH, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	8	dominio variable de la cadena ligera VL, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	9	CDR3H de la cadena pesada, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	10	CDR2H de la cadena pesada, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	11	CDR1H de la cadena pesada, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	12	CDR3L de la cadena ligera, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	13	CDR2L de la cadena ligera, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	14	CDR1L de la cadena ligera, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	15	dominio variable de la cadena pesada VH, variante <ANG-2> Ang2i <sub>LC10</sub>
SEQ ID NO:	16	dominio variable de la cadena ligera VL, variante <ANG-2>

		Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	17	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano; secuencia precursora de VEGF165 humano
SEQ ID NO:	18	Angiopoyetina-2 (ANG-2) humana
SEQ ID NO:	19	Angiopoyetina-1 (ANG-1) humana
SEQ ID NO:	20	Receptor Tie-2 humano
SEQ ID NO	21	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO	22	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO	23	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO	24	Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGF-Ang2-0012)
SEQ ID NO:	25	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	26	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	27	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	28	Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	29	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	30	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	31	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	32	Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	33	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 con mutaciones AAA
SEQ ID NO:	34	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 con mutaciones AAA
SEQ ID NO:	35	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 con mutaciones AAA
SEQ ID NO:	36	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	37	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	38	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE
SEQ ID NO:	39	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	40	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	41	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	42	Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	43	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	44	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	45	Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	46	Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	47	región constante de la cadena ligera kappa
SEQ ID NO:	48	región constante de la cadena ligera lambda
SEQ ID NO:	49	región constante de la cadena pesada derivada de IgG1 humana
SEQ ID NO:	50	región constante de la cadena pesada derivada de IgG4 humana

## Procedimientos experimentales

**Tabla 1: Anticuerpos biespecíficos y sus respectivas secuencias**

Descripción	Nombre corto	Secuencias
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 <b>con mutaciones AAA</b>	VEGFang2-0012	SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural ( <b>sin</b> mutaciones AAA)	VEGFang2-0201-	SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 <b>con mutaciones AAA y</b> mutaciones LALA P329G	VEGFang2-0016	SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo ( <b>sin</b> mutaciones AAA)	VEGFang2-0015	SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE	--	SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 con mutaciones AAA	-	SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE	-	SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38

Tenga en cuenta que el término "con (las) mutaciones AAA", como se usa en el presente documento, se refiere a las mutaciones I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) y H435A (His435Ala) en la región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG4 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), el término "con (las) mutaciones LALA P329G", como se usa en el presente documento, se refiere a las mutaciones L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) y P329G (Pro329Gly) en la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG1 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), y el término "con (las) mutaciones SPLE", como se usa en el presente documento, se refiere a las S228P (Ser228Pro) y L235E (Leu235Glu) la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG4 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

## Ejemplos

### Materiales y procedimientos generales

La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana se proporciona en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de los anticuerpos se numeran y se denominan de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

### Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Síntesis génica

Se ordenaron los segmentos de genes deseados de acuerdo con las especificaciones dadas en Geneart (Regensburg, Alemania).

### Determinación de la secuencia de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación bicatenaria realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

### Análisis de secuencia de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencia

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

## 5 Vectores de expresión

Para la expresión de los anticuerpos descritos, se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para células de expresión transitoria (por ejemplo, en HEK293-F) en base a una organización de ADNc con o sin un promotor de CMV-intrón A o bien en una organización genómica con un promotor de CMV.

Además del casete de expresión de anticuerpos, los vectores contenían:

- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*,
- un gen de  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*, y
- el gen de la dihidrofolato reductasa de *Mus musculus* como marcador seleccionable en células eucariotas
- La unidad de transcripción del gen de anticuerpo estaba compuesta de los siguientes elementos:
  - sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 5'
  - el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano,
  - seguido de la secuencia de intrón A en el caso de la organización de ADNc,
  - una región no traducida en 5' de un gen de anticuerpo humano,
  - una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina,
  - la cadena de anticuerpo humano (natural o con intercambio de dominios) como ADNc o bien como organización genómica con la organización exón-intrón de inmunoglobulina
  - una región no traducida en 3' con una secuencia señal de poliadenilación, y
  - sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 3'.

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpo como se describe a continuación se generaron por PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron por procedimientos y técnicas recombinantes conocidos mediante conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, usando sitios de restricción únicos en los respectivos vectores. Se verificaron las secuencias de ácido nucleico subclonadas mediante secuenciación de ADN. Para las transfecciones transitorias se prepararon mayores cantidades de los plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos transformados de *E. coli* (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

## Técnicas de cultivo celular

Se usaron técnicas de cultivo celular estándar como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante cotransfección transitoria de los respectivos plásmidos de expresión en células HEK29-F que crecen en suspensión como se describe a continuación.

## Ejemplo 1

### Expresión y purificación

#### Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Los anticuerpos biespecíficos se generaron por transfección transitoria con los plásmidos respectivos (por ejemplo, codificando la cadena pesada y pesada modificada, así como la cadena ligera y ligera modificada correspondiente) usando el sistema HEK293-F (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) que crecían en suspensión en un matraz de agitación o en un fermentador agitado en medio de expresión FreeStyle™ 293 sin suero (Invitrogen) con una mezcla de los cuatro plásmidos de expresión y 293fectin™ o fectina (Invitrogen). Para un matraz de agitación de 2 l (Corning), se sembraron células HEK293-F a una densidad de  $1,0 \times 10^6$  células/ml en 600 ml y se incubaron a 120 rpm, 8 %

de CO<sub>2</sub>. El día siguiente, las células se transfectaron a una densidad celular de aprox. 1,5 E\*6 células/ml con aprox. 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de ADN plasmídico total (1 µg/ml) que codificaba la cadena pesada o pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una proporción equimolar y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293fectin o fectina (2 µl/ml). De acuerdo con el consumo de glucosa, se añadió solución de glucosa durante el curso de la fermentación. El sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado se recogió después de 5-10 días y los anticuerpos se purificaron directamente del sobrenadante o el sobrenadante se congeló y se almacenó.

### Purificación

Se purificaron los anticuerpos bispecíficos de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando MabSelectSure-Sepharose™ (para mutantes que no son AAA) (GE Healthcare, Suecia) o kappaSelect-Agarose (para mutantes AAA) (GE Healthcare, Suecia), cromatografía de interacción hidrófoba usando butil-Sepharose (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia).

En resumen, se capturaron sobrenadantes de cultivo celular filtrados estériles en una resina MabSelect SuRe equilibrada con tampón de PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4), se lavaron con tampón de equilibrado y se eluyeron con citrato de sodio 25 mM a pH 3,0. Se capturaron los mutantes AAA en una resina kappaSelect equilibrada con Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, se lavaron con tampón de equilibrado y se eluyeron con citrato de sodio 25 mM pH 2,9. Se combinaron las fracciones de proteínas eluidas y se neutralizaron con Tris 2 M, pH 9,0. Se prepararon las mezclas de anticuerpos para la cromatografía de interacción hidrófoba añadiendo solución de sulfato de amonio 1,6 M a una concentración final de sulfato de amonio 0,8 M y se ajustó el pH a pH 5,0 usando ácido acético. Después de equilibrar la resina de butil-Sepharose con acetato de sodio 35 mM, sulfato de amonio 0,8 M, pH 5,0, se aplicaron los anticuerpos a la resina, se lavaron con tampón de equilibrado y se eluyeron con un gradiente lineal a acetato de sodio 35 mM pH 5,0. Las fracciones que contenían anticuerpos bispecíficos se combinaron y purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las fracciones que contenían anticuerpos bispecíficos se combinaron, se concentraron a la concentración requerida usando dispositivos de ultrafiltración Vivaspín (Sartorius Stedim Biotech S.A., Francia) y se almacenaron a -80 °C.

**Tabla 2: Rendimientos de anticuerpos <VEGF-ANG-2> bispecíficos**

	VEGFang2-0015 (sin mutación AAA)	VEGFang2-0016 (con mutación AAA)
Título en sobrenadante	64 µg/ml, (2 l = 128 mg)	n.a. (escala de 2 l)
Proteína A (MabSelectSure)	118 mg (~70 % de monómero)	n.a.
Kappa Select	n.a.	117 mg (~83 % de monómero)
Butil-Sepharose	60 mg	57 mg
SEC	35 mg (>95 % de monómero)	38 mg (>95 % de monómero)

Se analizaron la pureza y la integridad de los anticuerpos después de cada etapa de purificación mediante CE-SDS usando la tecnología de Labchip microfluídica (Caliper Life Science, EE. UU.). Se prepararon 5 µl de solución de proteína para el análisis por CE-SDS usando el kit de reactivo HT Protein Express de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizó en un sistema LabChip GXII usando un chip HT Protein Express. Los datos se analizaron usando el programa informático LabChip GX.

**Tabla 3: Eliminación de productos secundarios típicos mediante diferentes etapas de purificación secuencial determinada por CE-SDS.**

Etapas de purificación	VEGFang2-0015						VEGFang2-0016					
	% de área de pico* * análisis: CE-SDS (Labchip GXII de Caliper)											
	mab	¾ ab	(HC)2	½ ab	(LC)2	LC	mab	¾ ab	(HC)2	½ ab	(LC)2	LC
Mab Select Sure	55,7	19	10,6	9,8	3,5	0,9	-					
Kappa Select	-						63	13,4	3,5	6,1	5,8	7,4
Butil-Sepharose	81,4	1,9	2,3	8,2	3,6	1,8	76,2	1,3	0,7	8,3	7,7	5,8
Superdex 200 SEC	92,4	L8	2,6	1,4	0,5	0,5	99	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

El contenido agregado de las muestras de anticuerpos se analizó mediante SEC de alto rendimiento usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia) en tampón de migración 2xPBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 274 mM y KCl 5,4 mM, pH 7,4) a 25 °C. Se inyectaron 25 µg de proteína en la columna a un caudal de 0,75 ml/min y se eluyó en condiciones isocráticas durante 50 minutos.

Análogamente, se prepararon y purificaron los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> VEGFang2-0012 y VEGFang2-0201 con los siguientes rendimientos:

	VEGFang2-0012 (con mutación AAA)	VEGFang2-0201 (sin mutación AAA)
título // cantidad	-	36 µg/ml // 72 mg
Escala	2,1 l	2 l
Proteína A (MabSelectSure)	-	66 mg (~95 % de monómero)
kappaSelect	43 mg (~65 % de monómero)	-
Butil-Sepharose	-	45 mg
SEC	14 mg	21 mg (>98 % de monómero)
Rendimiento de hidroxipatita	8,5 mg (>98 % de monómero)	
Rendimiento total (recuperación)	8,5 mg (20 %)	21 mg (30 %)

También se puede preparar y purificar de forma análoga los anticuerpos <VEGF-ANG-2> biespecíficos <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE (SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32), <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 con mutaciones AAA (SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35) y <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y con mutaciones SPLE (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38).

## Ejemplo 2

### Análítica y desarrollabilidad

#### Medición de viscosidad basada en DLS a pequeña escala.

La medición de la viscosidad se realizó esencialmente como se describe en (He, F. et al., Analytical Biochemistry 399 (2009) 141-3). En resumen, se concentran las muestras a diversas concentraciones de proteína en succinato de arginina 200 mM, pH 5,5, antes de que añadir microesferas de látex de poliestireno (diámetro de 300 nm) y Polisorbato 20 (0,02 % v/v). Se transfieren las muestras a una placa óptica de 384 pocillos mediante centrifugación a través de una placa de filtro de 0,4 µm y se cubren con aceite de parafina. Se determina el diámetro aparente de las microesferas de látex mediante dispersión dinámica de la luz a 25 °C. Se puede calcular la viscosidad de la solución como  $\eta = \eta_0(rh/rh_0)$  ( $\eta$ : viscosidad;  $\eta_0$ : viscosidad del agua; rh: radio hidrodinámico aparente de las microesferas de látex; rh<sub>0</sub>: radio hidrodinámico de las microesferas de látex en agua).

Para permitir la comparación de diversas muestras a la misma concentración, se ajustaron los datos de viscosidad-concentración con la ecuación de Mooney (Ecuación 1) (Mooney, Colloid Sci, 1951; Monkos, Biochem. Biophys. Acta 1997) y se interpolaron los datos en consecuencia.

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{S\Phi}{1-K\Phi}\right) \quad \text{Ecuación 1}$$

(S: parámetro de interacción hidrodinámica de la proteína; K: factor de apiñamiento;  $\Phi$ : fracción de volumen de la proteína disuelta)

Los resultados se muestran en la figura 2: VEGFang2-0016 con mutaciones AAA en la parte Fc muestra una menor viscosidad a todas las temperaturas medidas en comparación con VEGFang2-0015 sin las mutaciones AAA en la parte Fc.

#### Temperatura de comienzo de la agregación por DLS

Se preparan las muestras a una concentración de 1 mg/ml en histidina/cloruro de histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se transfieren a una placa óptica de 384 pocillos mediante centrifugación a través de una placa de filtro de 0,4 µm y se cubren con aceite de parafina. Se mide repetidamente el radio hidrodinámico mediante dispersión dinámica de la luz, mientras se calientan las muestras a una tasa de 0,05 °C/min de 25 °C a 80 °C. La temperatura de comienzo de la agregación se define como la temperatura a la que el radio hidrodinámico se empieza a incrementar. Los resultados se muestran en la figura 3. En la figura 3 se muestra la agregación de VEGFang2-0015 sin las mutaciones AAA frente a VEGFang2-0016 con mutaciones AAA en la parte Fc.

VEGFang2-0016 mostró una temperatura de comienzo de la agregación de 61 °C, mientras que VEGFang2-0015 sin la mutaciones AAA mostró una temperatura de comienzo de 60 °C.

#### Curso de tiempo de DLS

Se preparan las muestras a una concentración de 1 mg/ml en histidina/cloruro de histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se transfieren a una placa óptica de 384 pocillos mediante centrifugación a través de una placa de filtro de 0,4 µm y se cubren con aceite de parafina. Se mide repetidamente el radio hidrodinámico mediante dispersión dinámica de la luz, mientras se mantienen las muestras a una temperatura constante de 50 °C durante hasta 145 horas. En este experimento, las tendencias de agregación de la proteína natural desplegada a temperatura elevada darían lugar a un incremento del diámetro de partícula promedio con el tiempo. Este procedimiento basado en DLS es muy sensible a los agregados, ya que estos contribuyen de manera sobreproporcionada a la intensidad de luz dispersada. Incluso después de 145 horas a 50 °C (una temperatura cercana a la temperatura de comienzo de la agregación, véase arriba), se descubrió un incremento del diámetro de partícula promedio de solo menos de 0,5 nm tanto para VEGFang2-0015 como para VEGFang2-0016.

#### Almacenamiento de 7 días a 40 °C a 100 mg/ml (incremento del PMA)

Se concentran las muestras a una concentración final de 100 mg/ml en succinato de arginina 200 mM, pH 5,5, se filtran de forma estéril y se almacenaron de forma estable a 40 °C durante 7 días. Antes y después del almacenamiento, se determina el contenido de especies de alto y bajo peso molecular (PMA y PMB, respectivamente) mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La diferencia en el contenido de PMA y PMB entre la muestra almacenada y una muestra medida inmediatamente después de la preparación se informa como "incremento de PMA" y "incremento de PMB", respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 4, que muestran que VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) muestra una mayor reducción del pico principal y un mayor incremento de PMA en comparación con VEGFang2-0016 (con mutación AAA). Sorprendentemente, VEGF Ang2-0016 (con mutación AAA) mostró una menor tendencia a la agregación en comparación con VEGFang2-0015 (sin mutación AAA).

**Tabla 4: Delta de picos principal, PMA y PMB después de 7 días a 40 °C**

	delta_área% (40 °C - (-80 °C))		
	Pico principal	PMA	PMB
VEGFang2-0015 (sin mutaciones AAA)	-3,56	2,89	0,67
VEGFang2-0016 (con mutaciones AAA)	-1,74	1,49	0,25

El análisis funcional de los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF y anti-Ang2 se evaluó mediante resonancia de plasmón de superficie (RPR) usando un instrumento BIAcore® T100 o T200 (GE Healthcare) a 25 °C. El sistema BIAcore® está bien establecido para el estudio de las interacciones moleculares. La tecnología de RPS se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa en la superficie provocados por la interacción del ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. La masa se incrementa si las moléculas se unen a ligandos inmovilizados en la superficie, y viceversa, la masa disminuye en caso de disociación del analito del ligando inmovilizado (reflejando la disociación del complejo). La RPS permite una monitorización continua en tiempo real de las uniones ligando/analito y, por tanto, la determinación de la constante de velocidad de asociación (ka), la constante de velocidad de disociación (kd) y la constante de equilibrio (KD).

#### Ejemplo 3

##### Unión a VEGF, Ang2, FcγR y FcRn

##### Afinidad cinética de las isoformas de VEGF, incluyendo la evaluación de la reactividad cruzada entre especies

Aproximadamente 12 000 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (10 µg/ml de anti-F(ab')<sub>2</sub> humano caprino; código de pedido: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) se acoplaron a un chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. El tampón de muestra y el tampón del sistema fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween-20 al 0,05 %), pH 7,4. Se fijó la cubeta de lectura a 25 °C y se fijó el bloque de muestra a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración. Se capturó el anticuerpo biespecífico inyectando una solución 50 nM durante 30 s a un caudal de 5 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección de hVEGF121 humano, mVEGF120 de ratón o rVEGF164 de rata a diversas concentraciones en solución durante 300 s a un caudal de 30 µl/min, partiendo de 300 nM en diluciones 1:3. Se monitorizó la fase de disociación durante hasta 1200 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. Se regeneró la superficie mediante un lavado de 60 s con una solución de glicina a pH 2,1 a un caudal de 30 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de anti-F(ab')<sub>2</sub> humano caprino.

También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de  $K_D$  aparente y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir. Los resultados se muestran en la tabla 5.

#### Afinidad en solución de Ang2, incluyendo la evaluación de la reactividad cruzada entre especies

La afinidad en solución mide la afinidad de una interacción al determinar la concentración de compañeros de interacción libres en una mezcla en equilibrio. El ensayo de afinidad en solución implica la mezcla de un anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>, mantenido a una concentración constante, con un ligando (= Ang2) a concentraciones variables. Se inmovilizaron las unidades de resonancia máximas posibles (por ejemplo, 17 000 unidades de resonancia (UR)) de un anticuerpo sobre la superficie del chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. El tampón de muestra y el tampón del sistema fueron HBS-P a pH 7,4. Se fijó la cubeta de lectura a 25 °C y el bloque de muestra a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración. Para generar una curva de calibración, se inyectaron concentraciones crecientes de Ang2 en una cubeta de lectura BIAcore que contenía el anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2> inmovilizado. Se determinó la cantidad de Ang2 unida como unidades de resonancia (UR) y se representó frente a la concentración. Se incubaron soluciones de cada ligando (11 concentraciones de 0 a 200 nM para el anticuerpo biespecífico <VEGF-ANG-2>) con Ang2 10 nM y se dejó que alcanzaran el equilibrio a temperatura ambiente. Se determinaron las concentraciones de Ang2 libre a partir de la curva de calibración generada antes y después de medir la respuesta de las soluciones con cantidades conocidas de Ang2. Se estableció un ajuste de 4 parámetros con Xlfit4 (IDBS Software) usando el Modelo 201 usando la concentración de Ang2 libre como eje de ordenadas y la concentración de anticuerpo usada para la inhibición como eje de abscisas. Se calculó la afinidad determinando el punto de inflexión de esta curva. Se regeneró la superficie mediante un lavado de 30 s con una solución de  $H_3PO_4$  al 0,85 % a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie acoplada al blanco. Los resultados se muestran en la tabla 6.

#### Afinidad por FcRn en estado estable

Para la medición de FcRn se usó una afinidad en estado estable para comparar los anticuerpos biespecíficos entre sí. El FcRn humano se diluyó en un tampón de acoplamiento (acetato de Na 10  $\mu$ g/ml, pH 5,0) y se inmovilizó en un chip C1 (GE Healthcare BR-1005-35) mediante un procedimiento de inmovilización dirigida usando un asistente BIAcore hasta una respuesta final de 200 UR. Se fijó la cubeta de lectura a 25 °C y el bloque de muestra a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración. El tampón de muestra y el tampón del sistema fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween-20 al 0,05 %), pH 6,0. Para evaluar diferentes concentraciones de IgG para cada anticuerpo, se preparó una concentración de 62,5 nM, 125 nM, 250 nM y 500 nM. El caudal se estableció en 30  $\mu$ l/min y las diferentes muestras se inyectaron consecutivamente sobre la superficie del chip, eligiendo el tiempo de asociación de 180 s. Se regeneró la superficie inyectando PBS-T pH 8 durante 60 s a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de blanco. También se restan las inyecciones de tampón (= referencia doble). Para el cálculo de la afinidad en estado estable se usó el procedimiento del programa informático BIA-Evaluation. En resumen, los valores de UR (UR máx.) se representaron frente a las concentraciones analizadas, proporcionando una curva dosis-respuesta. En base a un ajuste de 2 parámetros, se calcula la asíntota superior, permitiendo la determinación del valor de UR semimáximo y, por tanto, de la afinidad. Los resultados se muestran en la figura 5 y la tabla 7. De manera análoga, se puede determinar la afinidad por FcRn de macaco cangrejero, ratón y conejo.

#### Medición de FcgammaRIIIa

Para la medición de FcgammaRIIIa se usó un ensayo de unión directa. Se acoplaron aproximadamente 3000 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (1  $\mu$ g/ml de Penta-His, Quiagen) sobre un chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. El tampón de muestra y el tampón del sistema fueron HBS-P+ a pH 7,4. Se fijó la cubeta de lectura a 25 °C y el bloque de muestra a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración. Se capturó el receptor FcgammaRIIIa-His inyectando una solución 100 nM durante 60 s a un caudal de 5  $\mu$ l/min. Se midió la unión mediante la inyección de 100 nM de anticuerpo biespecífico o anticuerpos de control monoespecíficos (anti-Dig para un anticuerpo de subclase IgG1 y uno de subclase IgG4) durante 180 s a un caudal de 30  $\mu$ l/min. La superficie se regeneró en 120 segundos lavando con solución de glicina pH 2,5 a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Debido a que la unión a FcgammaRIIIa difiere del modelo 1:1 de Langmuir, con este ensayo solo se determinó la unión/no unión. De forma similar, se puede determinar la unión a FcgammaRIIa y FcgammaRIIa. Los resultados se muestran en la figura 6, donde se deduce que la introducción de las mutaciones LALA P329G provocó que ya no se pudiera detectar la unión a FcgammaRIIIa.

#### Evaluación de la unión independiente de VEGF y Ang2 a los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>

Se acoplaron aproximadamente 3500 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (10  $\mu$ g/ml de anti-IgG humana caprina; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) sobre un chip CM4 (GE Healthcare, BR-1005-34) a

pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. El tampón de muestra y el tampón del sistema fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween-20 al 0,05 %), pH 7,4. Se fijó la temperatura de la cubeta de lectura a 25 °C y la del bloque de muestra a 12 °C. Antes de la captura, se purgó dos veces la cubeta de lectura con tampón de migración.

Se capturó el anticuerpo biespecífico inyectando una solución 10 nM durante 60 s a un caudal de 5 µl/min. Se analizó la unión independiente de cada ligando al anticuerpo biespecífico determinando la capacidad de unión activa para cada ligando, añadido secuencial o bien simultáneamente (caudal de 30 µl/min):

1. Inyección de VEGF humano a una concentración de 200 nM durante 180 s (identifica la unión única del antígeno).

2. Inyección de Ang2 humana a una concentración de 100 nM durante 180 s (identifica la unión única del antígeno).

3. Inyección de VEGF humano a una concentración de 200 nM durante 180 s, seguida de una inyección adicional de Ang2 humana a una concentración de 100 nM durante 180 s (identifica la unión de Ang2 en presencia de VEGF).

4. Inyección de Ang2 humana a una concentración de 100 nM durante 180 s, seguida de una inyección adicional de VEGF humano a una concentración de 200 nM (identifica la unión de VEGF en presencia de Ang2).

5. Coinyección de VEGF humano a una concentración de 200 nM y de Ang2 humana a una concentración de 100 nM durante 180 s (identifica la unión de VEGF y de Ang2 al mismo tiempo).

Se regeneró la superficie mediante un lavado de 60 s con una solución de MgCl<sub>2</sub> 3 M a un caudal de 30 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de anti-IgG humana caprino.

El anticuerpo biespecífico se puede unir a ambos antígenos independientemente de forma mutua si la señal final resultante de los enfoques 3, 4 y 5 es igual o similar a la suma de las señales finales individuales de los enfoques 1 y 2. Los resultados se muestran en la tabla 9, donde se demuestra que ambos anticuerpos VEGFang2-0016, VEGFang2-0012 se pueden unir mutuamente de forma independiente a VEGF y ANG2

#### **Evaluación de la unión simultánea de VEGF y Ang2 a los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>**

En primer lugar, se acoplaron aproximadamente 1600 unidades de resonancia (UR) de VEGF (20 µg/ml) sobre un chip CM4 (GE Healthcare BR-1005-34) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. El tampón de muestra y el tampón del sistema fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %), pH 7,4. Se fijó la cubeta de lectura a 25 °C y el bloque de muestra a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración. En segundo lugar, se inyectó una solución 50 nM del anticuerpo biespecífico durante 180 s a un caudal de 30 µl/min. En tercer lugar, se inyectó hAng2 durante 180 s a un caudal de 30 µl/min. La respuesta de unión de hAng2 depende de la cantidad de anticuerpo biespecífico unido a VEGF y muestra la unión simultánea. Se regeneró la superficie mediante un lavado de 60 s con una solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,85 % a un caudal de 30 µl/min. La unión simultánea se muestra mediante una señal de unión específica adicional de hAng2 a los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> unidos previamente a VEGF. Para ambos anticuerpos biespecíficos VEGFang2-0015 y VEGFang2-0016, se pudo detectar la unión simultánea de VEGF y Ang2 a los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> (datos no mostrados).

**Tabla 5: Resultados: afinidades cinéticas por las isoformas de VEGF de diferentes especies**

	<b>VEGFang2-0015 – afinidad aparente</b>	<b>VEGFang2-0016 – afinidad aparente</b>	<b>VEGFang2-0012 – afinidad aparente</b>	<b>VEGFang2-0201 – afinidad aparente</b>
VEGF121 humano	≤1 pM (fuera de la especificación Biacore)	≤1 pM (fuera de la especificación Biacore)	≤1 pM (fuera de la especificación Biacore)	≤1 pM (fuera de la especificación Biacore)
VEGF120 de ratón	sin unión	sin unión	sin unión	sin unión
VEGF164 de rata	13 nM	14 nM	24 nM	35 nM

**Tabla 6: Resultados: afinidades en solución por Ang2**

	<b>KD de</b>	<b>KD de</b>	<b>KD de</b>	<b>KD de</b>
--	--------------	--------------	--------------	--------------

	VEGFang2-0015 [nM]	VEGFang2-0016 [nM]	VEGFang2-0012 [nM]	VEGFang2-0201 [nM]
Ang2 humana	8	20	20	por determinar
Ang2 de macaco cangr.	5	13	10	por determinar
Ang2 de ratón	8	13	8	por determinar
Ang2 de conejo	4	11	8	por determinar

**Tabla 7: Resultados: afinidad por FcRn de anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>**

	VEGFang2-0015 [afinidad]	VEGFang2-0016 [afinidad]	VEGFang2-0012 [afinidad]	VEGFang2-0201 [afinidad]
FcRn humano	0,8 µM	sin unión	sin unión	0,8 µM
FcRn de macaco cangr.	0,9 µM	sin unión	sin unión	1,0 µM
FcRn de ratón	0,2 µM	sin unión	sin unión	0,2 µM

**5      Tabla 8: Resultados de la unión a FcγRII - IIIa**

	VEGFang2-0015	VEGFang2-0016	VEGFang2-0012	VEGFang2-0201
FcγRIa	Sin unión	Sin unión	Unión	Unión
FcγRIIa	Sin unión	Sin unión	Sin unión	Unión
FcγRIIIa	Sin unión	Sin unión	Sin unión	Unión

**Tabla 9: Resultados: unión independiente de VEGF y Ang2 a anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>**

	1) Ang2 [URmáx.]	2) VEGF [URmáx.]	3) primero VEGF luego Ang2 [URmáx.]	4) primero Ang2 luego VEGF [URmáx.]	5) coinyección de Ang2+VEGF [URmáx.]
VEGFang2-0016	174	50	211	211	211
VEGFang2-0012	143	43	178	177	178

10

#### Ejemplo 4

#### Espectrometría de masas

15      Esta sección describe la caracterización de anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>, con énfasis en el correcto ensamblaje. Se confirmaron las estructuras primarias esperadas mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> desglucosilados e intactos o digeridos con IdeS (enzima degradante de IgG de *S. pyogenes*). La digestión con IdeS se realizó con 100 µg de anticuerpo purificado incubado con 2 µg de proteasa IdeS (Roche) en 100 mmol/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,1 a 37 °C durante 5 h. Posteriormente, se desglucosilaron los anticuerpos con N-glucosidasa F, neuraminidasa y O-glucosidasa (Roche) en 100 mmol/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,1 a 37 °C durante hasta 16 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml y posteriormente se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). Se determinó la masa total por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

25      Las masas obtenidas para las moléculas desglucosiladas y digeridas con IdeS (tabla 10) o desglucosiladas intactas (tabla 11) corresponden a las masas previstas deducidas de las secuencias de aminoácidos para los anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> que consisten en dos cadenas ligeras diferentes LC<sub>Ang2</sub> y LC<sub>Lucentis</sub>, y dos cadenas pesadas diferentes HC<sub>Ang2</sub> y HC<sub>Lucentis</sub>.

30

**Tabla 10: Masas de los anticuerpos biespecíficos <VEGF/ANG2> desglucosilados y digeridos con IdeS VEGFang2-0201 (sin mutación AAA) y VEGFang2-0012 (con mutación AAA)**

Muestra	F(ab') <sub>2</sub> del anticuerpo biespecífico VEGF-ANG-2>	Región Fc desglucosilada del anticuerpo biespecífico VEGF-ANG-2>
---------	---	--

	Masa promedio prevista [Da]	Masa promedio observada [Da]	Masa promedio prevista [Da]	Masa promedio observada [Da]
VEGFang2-0201	99360,8	99360,7	47439,2	47430,1
VEGFang2-0012	99360,8	99361,1	47087,7	47082,0

**Tabla 11: Masas de los anticuerpos <VEGF/ANG2> desglucosilados VEGFang2-0016 (con mutación AAA) y VEGFang2-0015 (sin mutación AAA)**

	<b>Anticuerpo biespecífico VEGF-ANG-2&gt; desglucosilado</b>	
	Masa promedio prevista [Da]	Masa promedio observada [Da]
VEGFang2-0016	146156,9	146161,2
VEGFang2-0015	146505,3	146509,4

5

### Ejemplo 5

#### Cromatografía de Fc-Rn

#### 10 Acoplamiento a estreptavidina Sepharose:

Se añadió un gramo de estreptavidina Sepharose (GE Healthcare) al receptor biotinilado y dializado y se incubó durante dos horas con agitación. Se cargó la Sepharose derivatizada con el receptor en una columna XK de 1 ml (GE Healthcare).

15

#### Cromatografía usando la columna de afinidad por FcRn:

Condiciones:

20 dimensiones de la columna: 50 mm x 5 mm

altura de lecho: 5 cm

25 carga: 50 µg de muestra

tampón de equilibrado: MES 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 5,5

tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,8

30 elución: 7,5 VC de tampón de equilibrado, en 30 VC hasta 100 % de tampón de elución, 10 VC de tampón de elución

#### Cromatografía en columna de afinidad por FcRn humano

35 En la siguiente tabla se proporcionan los tiempos de retención de anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> en columnas de afinidad que comprenden FcRn humano. Se obtuvieron los datos usando las condiciones anteriores. En la siguiente tabla se proporcionan los tiempos de retención de anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2> en FcRn humano.

#### 40 Tabla 12: Resultados: tiempos de retención de anticuerpos biespecíficos <VEGF-ANG-2>

anticuerpo	tiempo de retención [min]
VEGFang2-0015 (sin mutación AAA)	78,5
VEGFang2-0201 (sin mutación AAA)	78,9
VEGFang2-0012 (con mutación AAA)	2,7 (ausencia de pico)
VEGFang2-0016 (con mutación AAA)	2,7 (ausencia de pico)

### Ejemplo 6

#### 45 Propiedades farmacocinéticas (FC)

## Datos FC con ratones FcRn transgénicos para FcRn humano

### Fase in vivo

El estudio incluyó ratones C57BL/6J hembra (fondo), que eran ratones deficientes en FcRn pero transgénicos hemicigóicos para FcRn humano (huFcRn, línea 276 -/tg)

### Parte 1

A todos los ratones se les inyectaron una vez por vía intravítrea en el ojo derecho 2 µl/animal de la solución apropiada (es decir, 21 µg compuesto/animal (VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) o 23,6 µg de compuesto/animal (VEGFang2-0016 (con mutación AAA).

Los ratones se asignaron a 2 grupos con 6 animales cada uno. Se toman muestras de sangre del grupo 1 a las 2, 24 y 96 horas y del grupo 2 a las 7, 48 y 168 horas después de la dosificación.

La inyección en el vítreo del ojo derecho del ratón se realizó usando el sistema de microjeringa NanoFil para inyección de nanolitros de World Precision Instruments, Inc., Berlín, Alemania. Se anestesió a los ratones con isoflurano al 2,5 % y para la visualización del ojo del ratón se usó un microscopio Leica MZFL3 con un aumento de 40 veces y un anillo de luz con una iluminación LCD Leica KL2500. Posteriormente, se inyectaron 2 µl del compuesto usando una aguja de calibre 35.

Se extrajo sangre del plexo venoso retroocular del **ojo contralateral** de cada animal para la determinación de los niveles de compuesto en suero.

Se obtuvieron muestras de suero de al menos 50 µl de la sangre después de 1 hora a temperatura ambiente mediante centrifugación (9300 x g) a 4 °C durante 3 min. Las muestras de suero se congelaron directamente después de la centrifugación y se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis. Los ojos tratados de los animales del grupo 1 se aislaron 96 horas después del tratamiento y los de los animales del grupo 2 se aislaron 168 horas después del tratamiento. Las muestras se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

### Parte 2

A todos los ratones se les inyectaron una vez por vía intravenosa en la vena de la cola 200 µl/animal de la solución apropiada (es decir, 21 µg compuesto/animal (VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) o 23,6 µg de compuesto/animal (VEGFang2-0016 (con mutación AAA).

Los ratones se asignaron a 2 grupos con 5 animales cada uno. Se toman muestras de sangre del grupo 1 a las 1, 24 y 96 horas y del grupo 2 a las 7, 48 y 168 horas después de la dosificación. Se extrajo sangre del plexo venoso retroocular de cada animal para la determinación de los niveles de compuesto en suero.

Se obtuvieron muestras de suero de al menos 50 µl de la sangre después de 1 hora a temperatura ambiente mediante centrifugación (9300 x g) a 4 °C durante 3 min. Las muestras de suero se congelaron directamente después de la centrifugación y se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

### Preparación de lisados oculares completos (ratones)

Los lisados oculares se obtuvieron por desintegración fisicoquímica de todo el ojo de animales de laboratorio. Para la disgregación mecánica, se transfirió cada ojo a un microvial de 1,5 ml con fondo cónico. Después de la congelación y la descongelación, los ojos se lavaron una vez con 1 ml de tampón de lavado celular (Bio-Rad, kit de lisis celular Bio-Plex, ref. 171-304011). En la siguiente etapa, se añadieron 500 µl de tampón de lisis celular recién preparado y se molieron los ojos usando una mano de mortero de molienda de tejido de 1,5 ml (Kimble Chase, mano de mortero de 1,5 ml, art. n.º 749521-1500). A continuación, la mezcla se congeló y descongeló cinco veces y se volvió a moler. Para separar el lisado del tejido restante, se centrifugaron las muestras durante 4 min a 4500 x g. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su análisis posterior en el ELISA de cuantificación.

### Análisis

Las concentraciones de los anticuerpos <VEGF/ANG2> en el suero y los lisados oculares de los ratones se determinaron con un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Para la cuantificación de los anticuerpos <VEGF/ANG2> en muestras de suero y lisados oculares de ratón, se realizó un inmunoensayo de tipo sandwich en serie de fase sólida estándar con anticuerpos monoclonales biotinilados y digoxigenados usados como anticuerpos de captura y detección. Para verificar la integridad de la

biespecificidad del analito, el anticuerpo de captura biotinilado reconoce el sitio de unión anti-VEGF, mientras que el anticuerpo de detección digoxigenado se unirá al sitio de unión anti-Ang2 del analito. A continuación, se detecta el complejo inmunitario unido del anticuerpo de captura, analito y anticuerpo de detección en la fase sólida de la placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (SA-MTP) con una peroxidasa de rábano picante acoplada a un anticuerpo anti-digoxigenina. Después de lavar el material no unido de la SA-MTP y de la adición de sustrato ABTS, la señal conseguida es proporcional a la cantidad de analito unido en la fase sólida de la SA-MTP. A continuación, se realiza la cuantificación convirtiendo las señales medidas de las muestras en concentraciones referenciadas a los calibradores analizados en paralelo.

En una primera etapa, se recubrió la SA-MTP con 100 µl/pocillo de la solución de anticuerpo de captura biotinilado (mAb<Id<VEGF>>M-2.45.51-IgG-Bi(DDS)) con una concentración de 1 µg/ml durante una hora a 500 rpm en un agitador de MTP. Mientras tanto, se prepararon los calibradores, las muestras de control de calidad (CC) y las muestras. Los calibradores y las muestras de CC se diluyen al 2 % en una matriz de suero; las muestras se diluyeron hasta que las señales estuvieron dentro del intervalo lineal de los calibradores.

Después de recubrir la SA-MTP con el anticuerpo de captura, la placa se lavó tres veces con tampón de lavado y 300 µl/pocillo. Posteriormente, se pipetearon 100 µl/pocillo de los calibradores, las muestras de CC y las muestras en la SA-MTP y se incubaron de nuevo durante una hora a 500 rpm. El analito se unió ahora con su sitio de unión anti-VEGF por medio del anticuerpo de captura a la fase sólida de la SA-MTP. Después de la incubación y eliminación del analito no unido mediante lavado de la placa, se añadieron 100 µl/pocillo del primer anticuerpo de detección (mAb<Id<Ang2>>M-2.6.81-IgG-Dig(XOSu)) con una concentración de 250 ng/ml a la SA-MTP. De nuevo, se incubó la placa durante una hora a 500 rpm en un agitador. Después del lavado, se añadieron 100 µl/pocillo del segundo anticuerpo de detección ((pAb<Digoxigenina>S-Fab-POD (poli)) a una concentración de 50 mU/ml a los pocillos de la SA-MTP y se incubó nuevamente la placa durante una hora a 500 rpm. Después de una etapa de lavado final para eliminar el exceso del anticuerpo de detección, se añaden 100 µl/pocillo de sustrato (ABTS). El conjugado anticuerpo-enzima cataliza la reacción de color del sustrato ABTS®. A continuación, se midió la señal mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm ([405/490] nm)).

#### Evaluación farmacocinética

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental, usando el programa de evaluación farmacocinética WinNonlin™ (Pharsight), versión 5.2.1.

#### Resultados: A) Concentraciones séricas

Los resultados para las concentraciones séricas se muestran en las tablas 13 a 16 y las figuras 7B a 7C

**Tabla 13: VEGFAng2-0015 (sin mutación AAA): Comparación de concentraciones séricas después de aplicación intravítrea e intravenosa**

	Concentración sérica después de aplicación intravítrea	Concentración sérica después de aplicación intravenosa
ID	Conc. promedio [µg/ml]	Conc. promedio [µg/ml]
1h		17,7
2h	9,8	
7h	10,4	12,1
24h	6,4	8,3
48h	6,5	6,9
96h	3,4	4,1
168h	2,9	2,7

**Tabla 14: VEGFAng2-0016 (con mutación AAA): Comparación de concentraciones séricas después de aplicación intravítrea e intravenosa**

	Concentración sérica después de aplicación intravítrea	Concentración sérica después de aplicación intravenosa
ID	Conc. promedio [µg/ml]	Conc. promedio [µg/ml]
1h		18,4
2h	7,0	
7h	8,7	10,0
24h	2,2	3,3
48h	1,0	1,0
96h	0,1	0,1
168h	0,0	0,0

**Tabla 15: VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) y VEGFang2-0016 (con mutación AAA): Comparación de concentraciones séricas después de aplicación intravítrea**

	VEGFang2-0015 (sin mutación AAA)	VEGFang2-0016 (con mutación AAA)
ID	Conc. promedio [µg/ml]	Conc. promedio [µg/ml]
2h	9,8	7,0
7h	10,4	8,7
24h	6,4	2,2
48h	6,5	1,0
96h	3,4	0,1
168h	2,9	0,0

5

**Tabla 16: VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) y VEGFang2-0016 (con mutación AAA): Comparación de concentraciones séricas después de aplicación intravenosa**

	VEGFang2-0015 (sin mutación AAA)	VEGFang2-0016 (con mutación AAA)
ID	Conc. promedio [µg/ml]	Conc. promedio [µg/ml]
1h	17,7	18,4
7h	12,1	10,0
24h	8,3	3,3
48h	6,9	1,0
96h	4,1	0,1
168h	2,7	0,0

#### 10 Resultados: B) Concentraciones en lisados oculares de ojos izquierdo y derecho

Los resultados de las concentraciones en lisados oculares se muestran en las tablas 17 a 18 y en las figuras 7D a 7E

#### 15 Tabla 17a: Concentraciones de VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) en lisados oculares después de aplicación intravítrea en el ojo derecho

Valores de conc. media de n = 6 ratones		
ID		conc. media [ng/ml]
96h	Ojo izquierdo	8,7
	Ojo derecho	46,1
168h	Ojo izquierdo	4,3
	Ojo derecho	12,9

#### 20 Tabla 17b: Concentraciones de VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) en lisados oculares después de aplicación intravenosa

Valores de conc. media de n = 5 ratones		
ID		conc. media [ng/ml]
96h	Ojo izquierdo	4,2
	Ojo derecho	7,5
168h	Ojo izquierdo	3,4
	Ojo derecho	6,1

#### 25 Tabla 18a: Concentraciones de VEGFang2-0016 (con mutación AAA) en lisados oculares después de aplicación intravítrea en el ojo derecho

Valores de conc. media de n = 5 ratones		
ID		conc. media [ng/ml]
96h	Ojo izquierdo	0,3
	Ojo derecho	34,5
168h	Ojo izquierdo	0,1
	Ojo derecho	9,0

#### Tabla 18b: Concentraciones de VEGFang2-0016 (con mutación AAA) en lisados oculares después de aplicación intravenosa

Valores de conc. media de n = 5 ratones		
ID		conc. media [ng/ml]
96h	Ojo izquierdo	0,0
	Ojo derecho	0,1
168h	Ojo izquierdo	0,0
	Ojo derecho	0,1

#### Resumen de resultados:

- 5 Después de la aplicación intravítrea, el anticuerpo biespecífico <VEGF/ANG2> de acuerdo con la invención VEGFang2-0016 (con mutación AAA) muestra concentraciones similares (después de 96 y 168 horas) en los lisados oculares en comparación con el anticuerpo biespecífico <VEGF/ANG2> sin mutación AAA VEGFang2-0015.
- 10 También después de la aplicación intravítrea, el anticuerpo biespecífico <VEGF/ANG2> de acuerdo con la invención VEGFang2-0016 (con mutación AAA) muestra además un aclaramiento más rápido y una semivida más corta en suero en comparación con el anticuerpo biespecífico <VEGF/ANG2> sin mutación AAA VEGFang2-0015.

#### 15 Ejemplo 7

##### Ensayo de angiogénesis en microbolsillo corneal de ratón

- 20 Para someter a prueba el efecto anti-angiogénico del anticuerpo biespecífico <VEGF/ANG2> con los respectivos VH y VL anti-VEGF de SEQ ID NO: 7 y 8 y los VH y VL anti-ANG2 de SEQ ID NO: 15 y 16 en la angiogénesis inducida por VEGF in vivo, los autores realizaron un ensayo de angiogénesis en microbolsillo corneal de ratón. En este ensayo se implantó un disco Nylaflo empapado de VEGF en un bolsillo de la córnea avascular a una distancia fija de los vasos del limbo. Los vasos crecen inmediatamente en la córnea hacia el gradiente de VEGF en desarrollo. Se adquirieron ratones Balb/c hembra de 8 a 10 semanas de edad de Charles River, Sulzfeld,
- 25 Alemania. El protocolo se modifica de acuerdo con el procedimiento descrito por Rogers, M.S., et al., Nat. Protoc. 2 (2007) 2545-2550. En resumen, se preparan microbolsillos con una anchura de aproximadamente 500 µm bajo un microscopio a aproximadamente 1 mm desde el limbo hasta la parte superior de la córnea usando un bisturí quirúrgico y unas pinzas afiladas en el ratón anestesiado. Se implanta el disco (Nylaflo®, Pall Corporation, Michigan) con un diámetro de 0,6 mm y se alisó la superficie del área de implantación. Los discos se incuban en
- 30 el factor de crecimiento correspondiente o en un vehículo durante al menos 30 min. Después de 3, 5 y 7 días (o, de forma alternativa, solo después de 3, 5 o 7 días), se fotografían los ojos y se mide la respuesta vascular. El ensayo se cuantifica calculando el porcentaje del área de nuevos vasos por área total de la córnea.

- 35 Los discos se cargan con 300 ng de VEGF o con PBS como control y se implantan durante 7 días. El crecimiento de los vasos desde el limbo hasta el disco se monitoriza a lo largo del tiempo los días 3, 5 y/o 7. Un día antes de la implantación del disco, se administran los anticuerpos por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg (debido a la aplicación intravenosa, se usa como sustituto el VEGFang2-0015 (sin mutación AAA) estable en suero que solo difiere del VEGFang2-0016 por la mutación AAA y tiene los mismos VH y VL anti-VEGF y anti-ANG2 para mediar en la eficacia) para someter a prueba el efecto anti-angiogénico en la angiogénesis inducida por VEGF in vivo. Los animales del grupo de control reciben el vehículo. El volumen de aplicación es de 10 µl/kg.
- 40

LISTADO DE SECUENCIAS

F. Hoffmann-La Roche AG

5 Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-ANG-2 y su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares  
oculares

31094 WO

10 EP12176299.1

13-07-2012

15 PatentIn versión 3.5

20 PRT

Artificial

25 CDR3H de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

30 PRT

Artificial

35 CDR2H de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys  
1 5 10 15

40 Arg

45 PRT

Artificial

50 CDR1H de la cadena pesada, <VEGF>ranibizumab

His Tyr Gly Met Asn  
1 5

55 PRT

Artificial

CDR3L de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

5

Aln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr  
L 5

10

PRT

15

Artificial

CDR2L de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

20

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser  
1 5

25

1

PRT

30

Artificial

CDR1L de la cadena ligera, <VEGF>ranibizumab

35

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

40

PRT

Artificial

45

dominio variable de la cadena pesada VH, <VEGF>ranibizumab

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

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

50

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

# ES 2 896 493 T3

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

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

5

PRT

10

Artificial

dominio variable de la cadena ligera VL, <VEGF>ranibizumab

15

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

PRT

Artificial

5

CDR3H de la cadena pesada, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

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

Ala Phe Asp Ile  
20

15

PRT

20

Artificial

CDR2H de la cadena pesada, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

25

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

Gly

30

PRT

Artificial

35

CDR1H de la cadena pesada, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

40 Gly Tyr Tyr Met His  
1 5

45

PRT

Artificial

50

CDR3L de la cadena ligera, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

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

5 PRT  
Artificial

10 CDR2L de la cadena ligera, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

15 **Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser**  
**1 5**

20 PRT  
Artificial

25 CDR1L de la cadena ligera, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

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

35 PRT  
Artificial

40 dominio variable de la cadena pesada VH, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

5

10 PRT  
Artificial

15 dominio variable de la cadena ligera VL, variante <ANG-2> Ang2i\_LC10

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

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

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

# ES 2 896 493 T3

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

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

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

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

5

PRT

Homo sapiens

10

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu  
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr  
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln  
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
180 185 190

5

PRT

Homo sapiens

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 896 493 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp  
435 440 445

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

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

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

5

PRT

Homo sapiens

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln  
355 360 365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg  
370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn  
385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser  
405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn  
420 425 430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp  
435 440 445

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala  
450 455 460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys  
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu  
485 490 495

Asp Phe

5

PRT

10 Homo sapiens

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

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

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

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

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

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

Asn	Gly	Ala	Tyr	Phe	Cys	Glu	Gly	Arg	Val	Arg	Gly	Glu	Ala	Ile	Arg
			100					105					110		
Ile	Arg	Thr	Met	Lys	Met	Arg	Gln	Gln	Ala	Ser	Phe	Leu	Pro	Ala	Thr
			115				120					125			
Leu	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Gly	Asp	Asn	Val	Asn	Ile	Ser	Phe	Lys
			130			135					140				
Lys	Val	Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Asp	Ala	Val	Ile	Tyr	Lys	Asn	Gly	Ser
			145		150					155					160
Phe	Ile	His	Ser	Val	Pro	Arg	His	Glu	Val	Pro	Asp	Ile	Leu	Glu	Val
				165					170					175	
His	Leu	Pro	His	Ala	Gln	Pro	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Ser	Ala	Arg
			180					185					190		
Tyr	Ile	Gly	Gly	Asn	Leu	Phe	Thr	Ser	Ala	Phe	Thr	Arg	Leu	Ile	Val
			195				200					205			
Arg	Arg	Cys	Glu	Ala	Gln	Lys	Trp	Gly	Pro	Glu	Cys	Asn	His	Leu	Cys
			210			215					220				
Thr	Ala	Cys	Met	Asn	Asn	Gly	Val	Cys	His	Glu	Asp	Thr	Gly	Glu	Cys
			225		230					235					240
Ile	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Met	Gly	Arg	Thr	Cys	Glu	Lys	Ala	Cys	Glu
				245				250						255	
Leu	His	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Cys	Lys	Glu	Arg	Cys	Ser	Gly	Gln	Glu
				260				265					270		
Gly	Cys	Lys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Leu	Pro	Asp	Pro	Tyr	Gly	Cys	Ser
			275				280					285			
Cys	Ala	Thr	Gly	Trp	Lys	Gly	Leu	Gln	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	His	Pro
			290			295					300				
Gly	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asp	Cys	Lys	Leu	Arg	Cys	Ser	Cys	Asn	Asn	Gly
			305		310					315					320
Glu	Met	Cys	Asp	Arg	Phe	Gln	Gly	Cys	Leu	Cys	Ser	Pro	Gly	Trp	Gln
				325					330					335	
Gly	Leu	Gln	Cys	Glu	Arg	Glu	Gly	Ile	Pro	Arg	Met	Thr	Pro	Lys	Ile
			340				345						350		

Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro  
355 360 365

Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr  
370 375 380

Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His  
385 390 395 400

Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro  
405 410 415

Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met  
420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

PRT

Artificial

10

Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGFang2-0012)

15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
245 250 255

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

5

PRT

10

Artificial

Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGFang2-0012)

15

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	100	105	110
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	115	120	125
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	130	135	140
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	145	150	155
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	180	185	190
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	195	200	205
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	210	215	220
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	225	230	235
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	245	250	255
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr	260	265	270
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	275	280	285
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	290	295	300
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	305	310	315
Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	325	330	335
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	340	345	350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

5

10 PRT  
Artificial

15 Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGFang2-0012)

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

5

10 PRT  
Artificial

15 Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA (VEGF-Ang2-0012)

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
130 135 140

Ileu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
180 185 190

Lys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
195 200 205

Ileu Pro Lys Ser Cys  
210

5

10 PRT

Artificial

15 Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G  
(VEGFang2-0016)

# ES 2 896 493 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala  
 225 230 235 240

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

5

PRT

10 Artificial

Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G  
(VEGFang2-0016)

15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr  
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

# ES 2 896 493 T3

305		310		315		320									
Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				325					330					335	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
			340					345					350		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala
	370					375					380				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405					410					415	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			420					425					430		
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
		435					440					445			
His	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
	450					455					460				

5

PRT

10

Artificial

Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G (VEGFang2-0016)

15

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5

PRT

10

Artificial

# ES 2 896 493 T3

Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones AAA y mutaciones LALA P329G (VEGFang2-0016)

5

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

PRT

5 Artificial

Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

10

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

# ES 2 896 493 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Gly Lys  
450

5

PRT

Artificial

10

Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val  
260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
305 310 315 320

Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
325 330 335

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln  
355 360 365

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly  
370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala  
435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
450 455 460

5

PRT

Artificial

10

Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

15

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

# ES 2 896 493 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5

PRT

Artificial

10

Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

```

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
          100          105          110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
          115          120          125

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130          135          140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145          150          155          160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
          180          185          190

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
          195          200          205

Glu Ser Lys Tyr Gly
210

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

# ES 2 896 493 T3

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

5

PRT  
Artificial

Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 con mutaciones AAA

Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	20	25	30	
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	35	40	45	
Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	50	55	60	
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	65	70	75	80
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	85	90	95	
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	100	105	110	
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	115	120	125	
Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	130	135	140	
Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	165	170	175	
Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	180	185	190	
Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	195	200	205	
Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	225	230	235	240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu  
245 250 255

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
290 295 300

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
305 310 315 320

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp  
325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp  
340 345 350

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
355 360 365

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
370 375 380

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
385 390 395 400

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
405 410 415

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
420 425 430

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
435 440 445

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
450 455 460

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
465 470 475 480

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
485 490 495

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser  
500 505 510

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
515 520 525

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
530 535 540

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
545 550 555 560

Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
565 570 575

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
580 585 590

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
595 600 605

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp  
610 615 620

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
625 630 635 640

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
645 650 655

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
660 665 670

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
675 680 685

Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
690 695 700

Lys  
705

Cadena ligera 1 de &lt;VEGF-ANG-2&gt; OAscFab IgG1 con mutaciones AAA

5

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5	PRT
	Artificial
10	Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
 210 215 220

ES 2 896 493 T3

Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	
				245					250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	
			260					265					270			
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275					280					285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290					295					300					
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	
				325					330					335		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	
			340					345					350			
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
		355					360					365				
Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370					375					380					
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
385					390					395					400	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	
				405					410					415		
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
			420					425					430			
Glu	Ala	Leu	His	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	
		435					440					445				
Gly	Lys															
	450															

PRT

Artificial

5

Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

```

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
          115          120          125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
          130          135          140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
          145          150          155          160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
          165          170          175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
          180          185          190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
          195          200          205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

```

210		215		220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly				
225		230		235
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu				
		245	250	255
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly				
		260	265	270
Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly				
		275	280	285
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr				
		290	295	300
Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr				
		305	310	315
Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp				
		325	330	335
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp				
		340	345	350
Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly				
		355	360	365
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe				
		370	375	380
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu				
		385	390	395
				400
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp				
		405	410	415
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu				
		420	425	430
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser				
		435	440	445
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro				
		450	455	460

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
465 470 475 480

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
485 490 495

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro  
500 505 510

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
515 520 525

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
530 535 540

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
545 550 555 560

Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
565 570 575

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
580 585 590

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
595 600 605

Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val  
610 615 620

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
645 650 655

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
660 665 670

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
675 680 685

Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
690 695 700

PRT

Artificial

5

Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 con mutaciones AAA y mutaciones SPLE

10

# ES 2 896 493 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

# ES 2 896 493 T3

Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)

5

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Thr	His	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	50	55	60	
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	195	200	205	

Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
210						215					220					
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
225					230					235					240	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245					250					255		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
			260					265					270			
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
		275					280					285				
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
	290					295					300					
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
305					310					315					320	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
				325					330					335		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
			340					345					350			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
		355					360					365				
Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
	370				375						380					
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
385					390					395					400	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
				405					410					415		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
			420					425					430			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
		435					440					445				
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
			450													

5	PRT
	Artificial
10	Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	
			20					25					30			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	
			100					105					110			
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	
		115					120					125				
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	
	130					135					140					
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	
145					150					155				160		
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	
				165					170					175		
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	
			180					185					190			
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	
		195					200					205				

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 245 250 255  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
 355 360 365  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
 370 375 380  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 405 410 415  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

5

PRT

Artificial

10

Cadena ligera 1 de &lt;VEGF-ANG-2&gt; CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

# ES 2 896 493 T3

195

200

205

**Phe Asn Arg Gly Glu Cys**  
**210**

5

PRT

Artificial

10

Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 natural (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0201)

15

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

5

PRT

10

Artificial

Cadena pesada 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)

5

```

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50           55           60

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

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
          100          105          110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
          115          120          125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
          130          135          140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

```

	165		170		175
Pro Ala Val	Leu Gln Ser Ser Gly	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	Val Val		
	180	185	190		
Thr Val Pro	Ser Ser Ser Leu Gly	Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
	195	200	205		
Asn His Lys	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys				
	210	215	220		
Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala				
	225	230	235		240
Ala Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr				
	245	250	255		
Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val				
	260	265	270		
Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val				
	275	280	285		
Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser				
	290	295	300		
Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu				
	305	310	315		320
Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala				
	325	330	335		
Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro				
	340	345	350		
Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln				
	355	360	365		
Val Ser Leu	Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala				
	370	375	380		
Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr				
	385	390	395		400
Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				
	405	410	415		

# ES 2 896 493 T3

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

5

PRT

Artificial

10

Cadena pesada 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)

15

# ES 2 896 493 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	20	25	30	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	100	105	110	
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	115	120	125	
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	130	135	140	
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	145	150	155	160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
 355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 405 410 415

# ES 2 896 493 T3

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

5

PRT

Artificial

10

Cadena ligera 1 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)

15

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5

PRT

Artificial

10

# ES 2 896 493 T3

Cadena ligera 2 de <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 con mutaciones LALA P329G solo (sin mutaciones AAA) (VEGFang2-0015)

5

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

# ES 2 896 493 T3

PRT

5 Homo sapiens

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1          5          10          15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20          25          30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35          40          45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          50          55          60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65          70          75          80

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100          105

```

10

PRT

homo sapiens

20

# ES 2 896 493 T3

Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu
1				5					10					15	
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val
		35					40					45			
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys
	50					55					60				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser
65					70					75				80	
His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu
				85					90					95	
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser							
			100					105							

5

PRT

Homo sapiens

10

# ES 2 896 493 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

ES 2 896 493 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35					40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50					55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	
65					70				75						80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85					90						95		
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	
			100					105					110			
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
		115					120					125				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
	130					135					140					
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
145					150					155					160	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
				165					170					175		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
			180					185					190			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
		195					200					205				
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
	210					215					220					
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				245					250					255		

# ES 2 896 493 T3

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico o una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad vascular ocular,  
 5 en el que la enfermedad vascular ocular es retinopatía diabética, edema macular diabético o degeneración macular senil,  
 en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 humana,  
 10 en el que
  - i) dicho primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF comprende, en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3H de SEQ ID NO: 1, una región CDR2H de SEQ ID NO: 2 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 3 y, en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3L de SEQ ID NO: 4, una región CDR2L de SEQ ID NO: 5 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 6, y  
 15
  - ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a ANG-2 comprende, en el dominio variable de la cadena pesada, una región CDR3H de SEQ ID NO: 9, una región CDR2H de SEQ ID NO: 10 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 11 y, en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3L de SEQ ID NO: 12, una región CDR2L de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 14, y en el que  
 20
  - iii) el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana derivada de origen humano y que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat.  
 25
2. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de la cadena pesada de la subclase IgG1 comprende además las mutaciones L234A, L235A y P329G, numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat.  
 30
3. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es bivalente y comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, de SEQ ID NO: 26, de SEQ ID NO: 27 y de SEQ ID NO: 28.  
 35
4. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es para administración por medio de aplicación intravítrea.  
 40
5. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enfermedad vascular ocular es retinopatía diabética.  
 45
6. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enfermedad vascular ocular es edema macular diabético.  
 50
7. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la degeneración macular es la degeneración macular senil (DMS).

**Fig. 1**

Difusión + corta semivida en circulación/suero

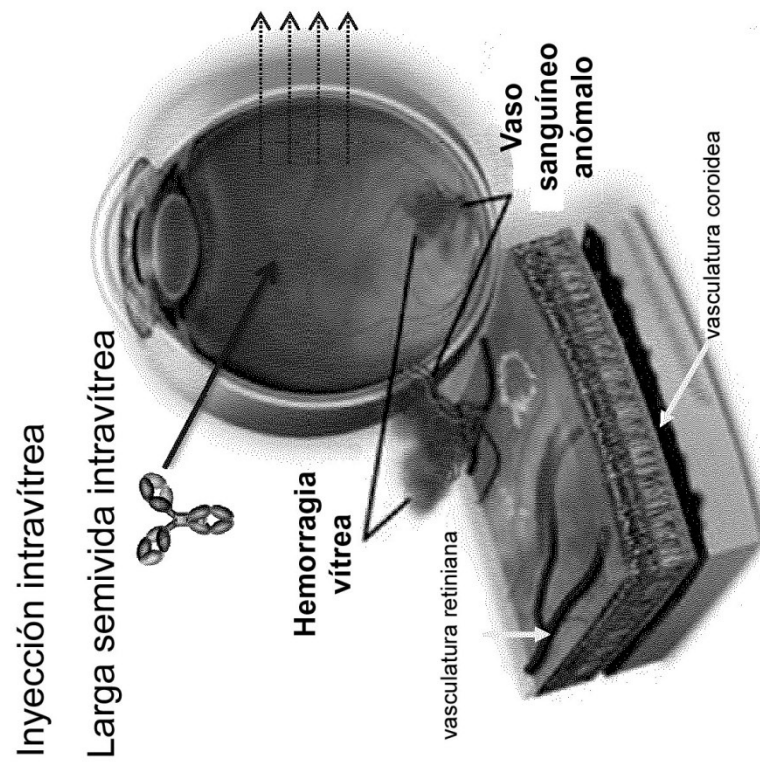


Fig. 2

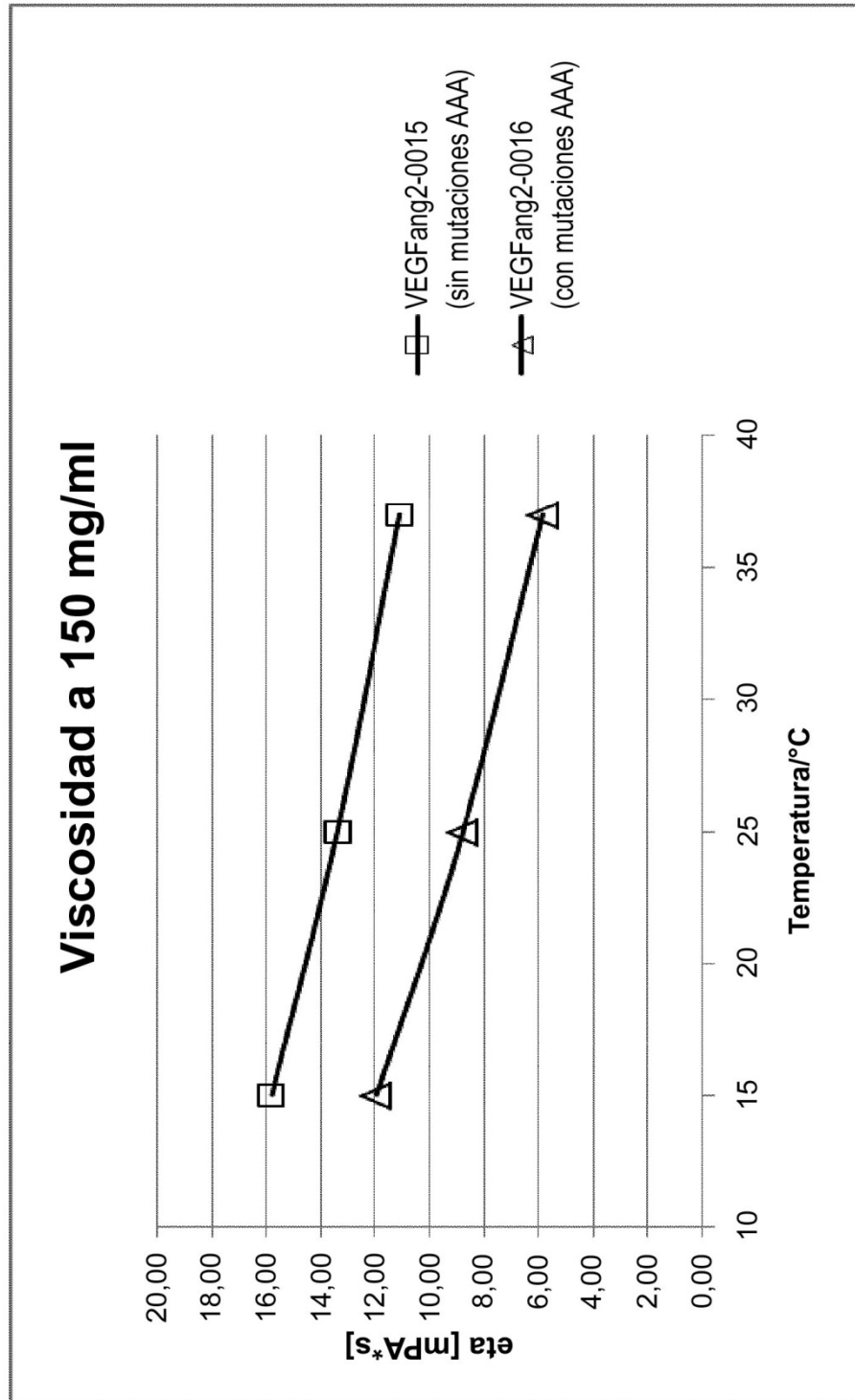
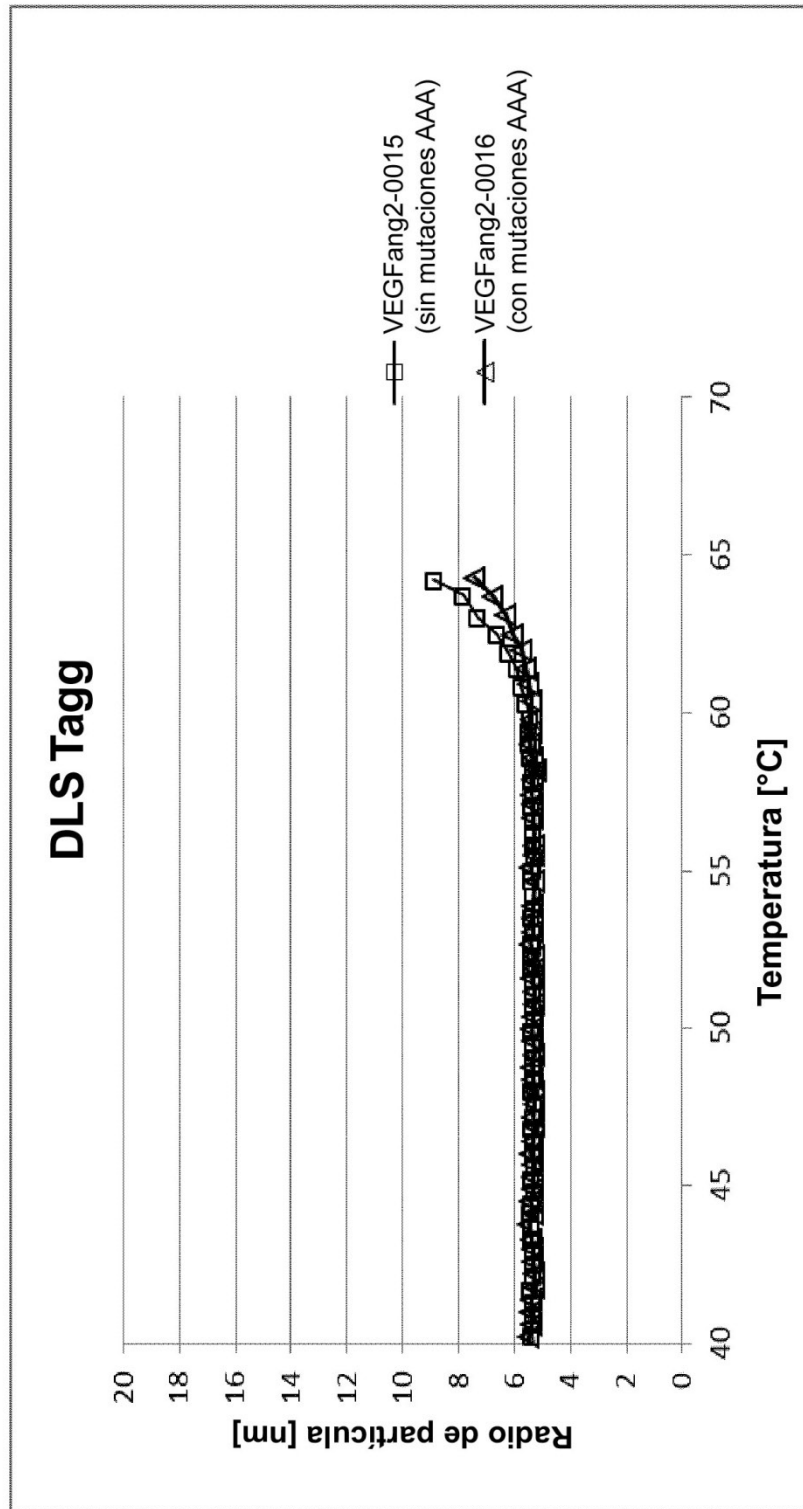
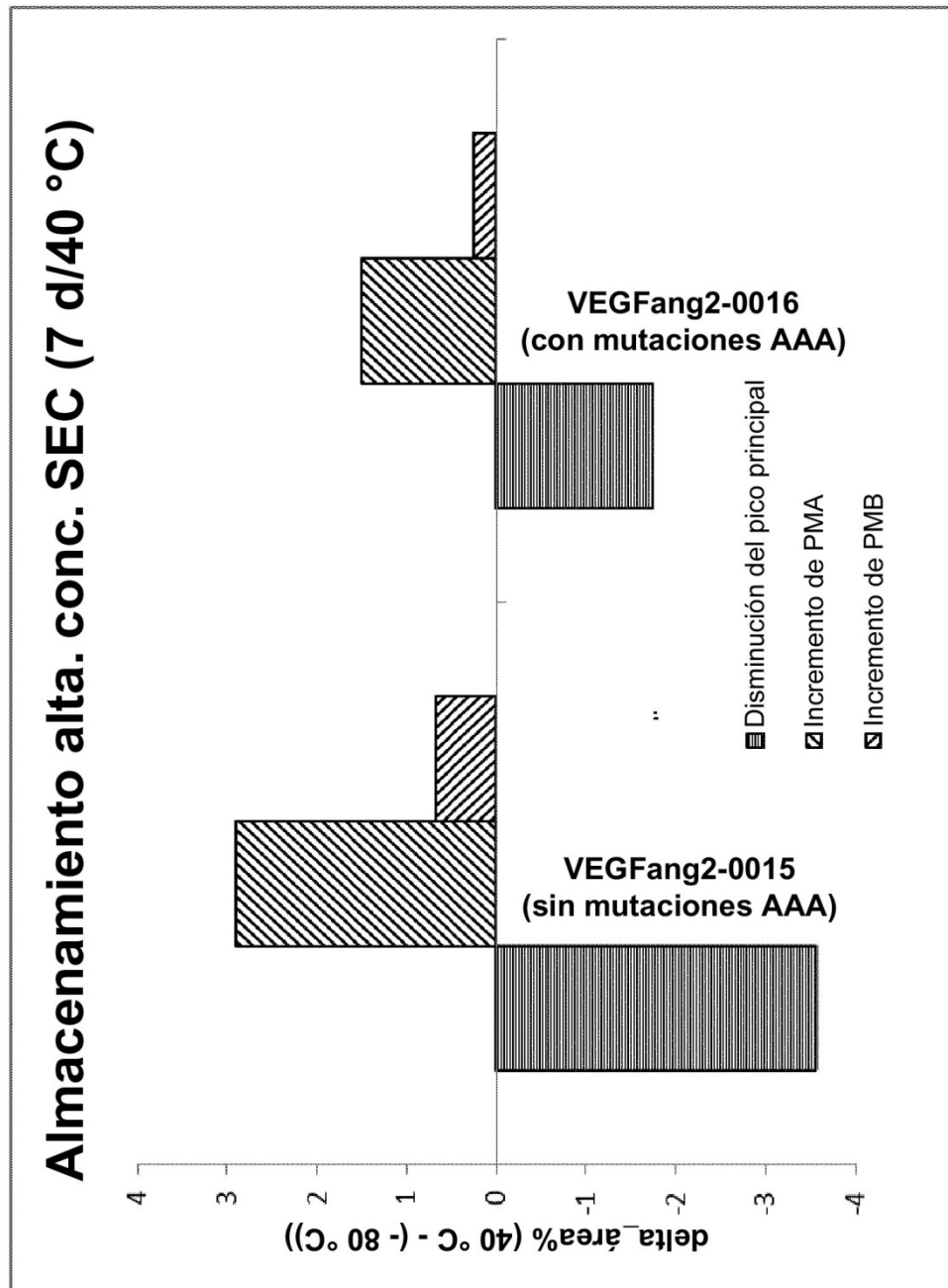


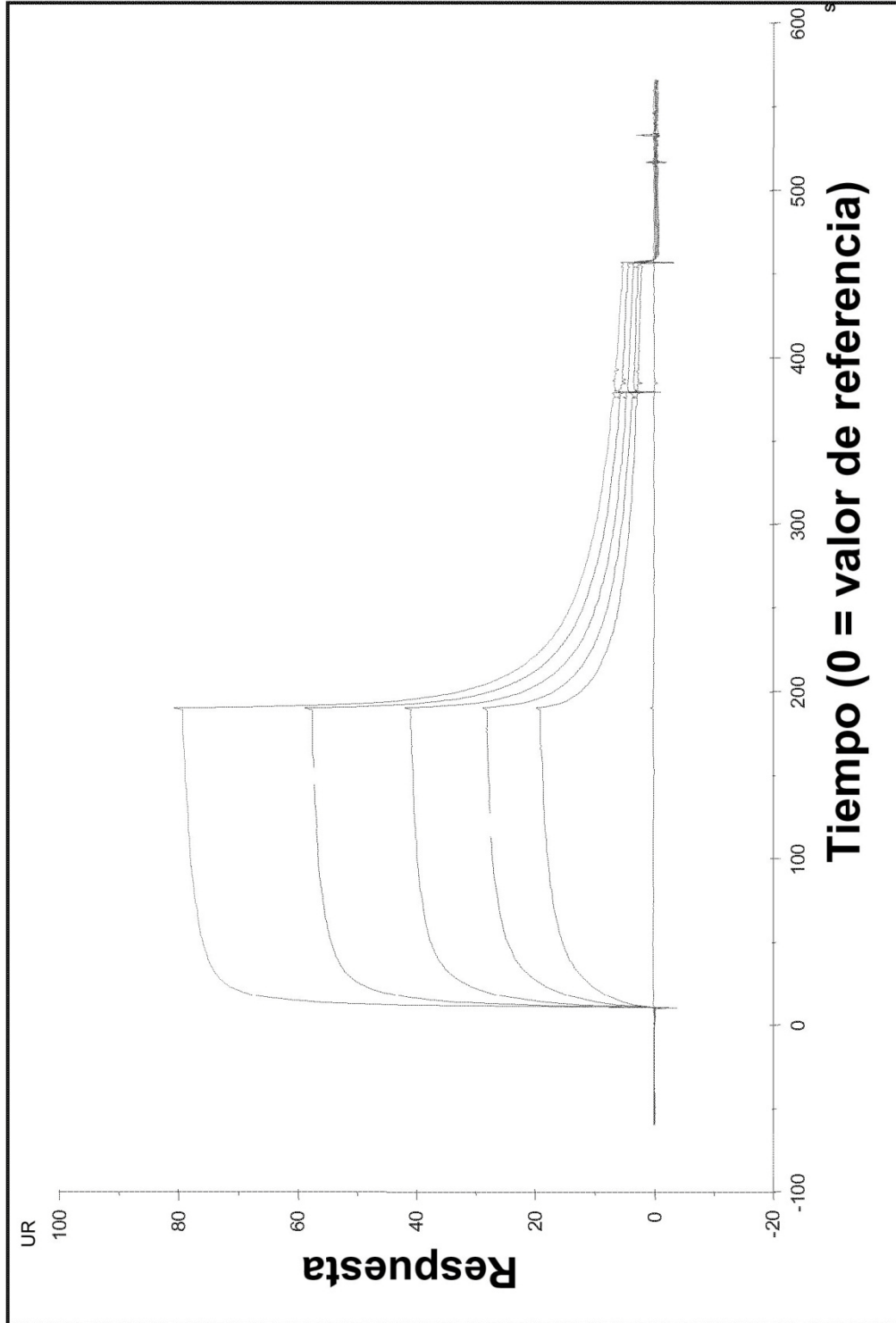
Fig. 3

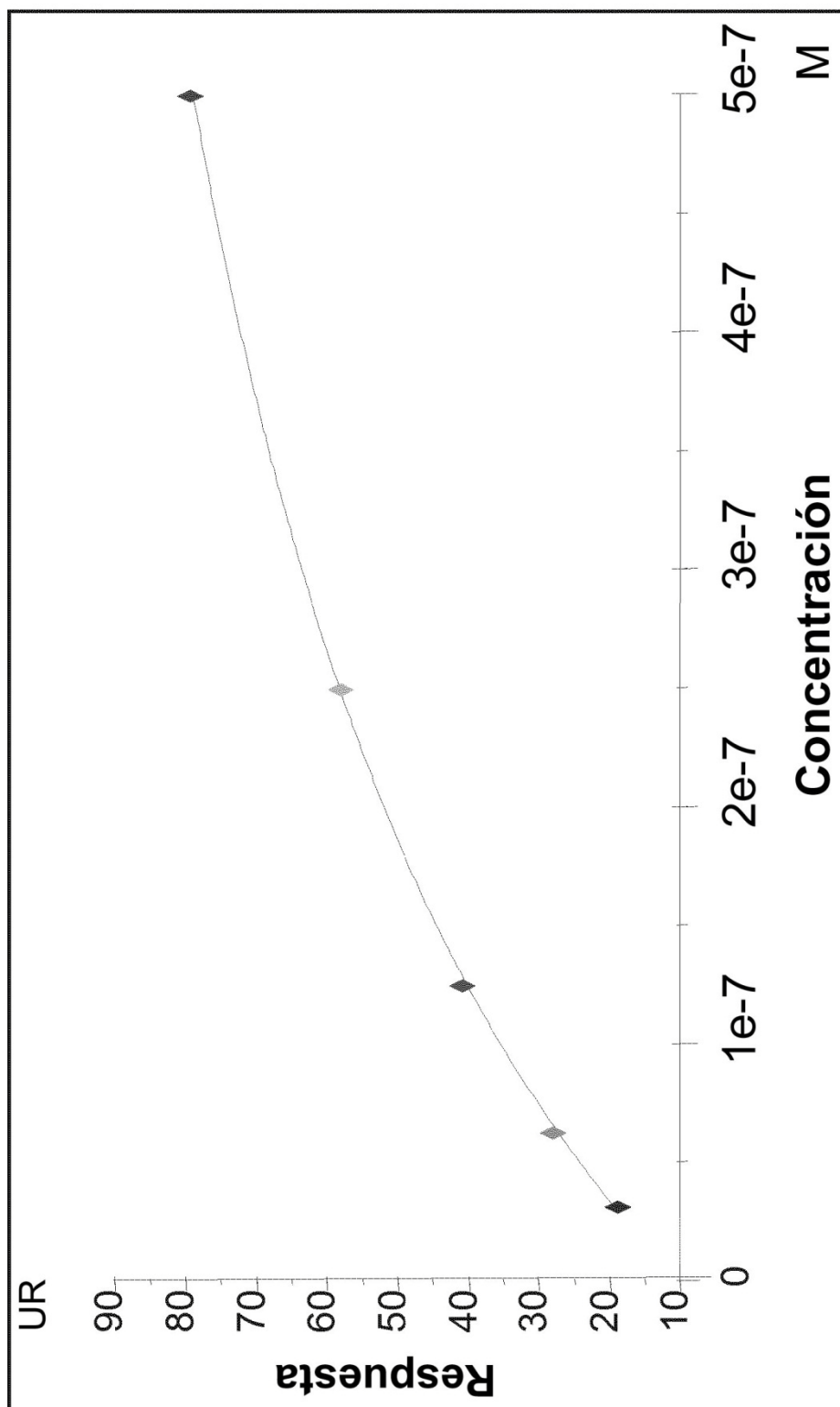


**Fig. 4**

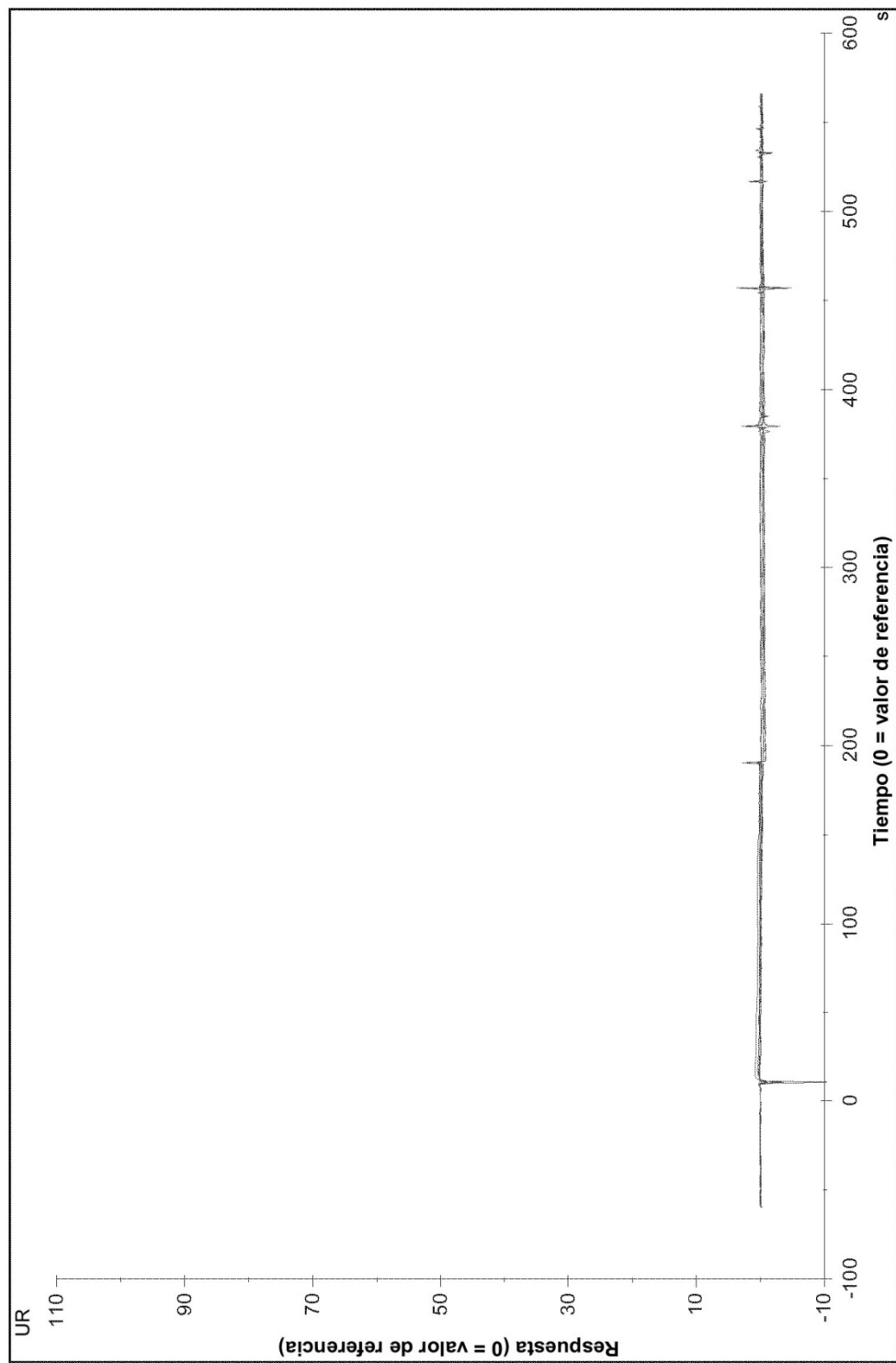


**Fig. 5A**

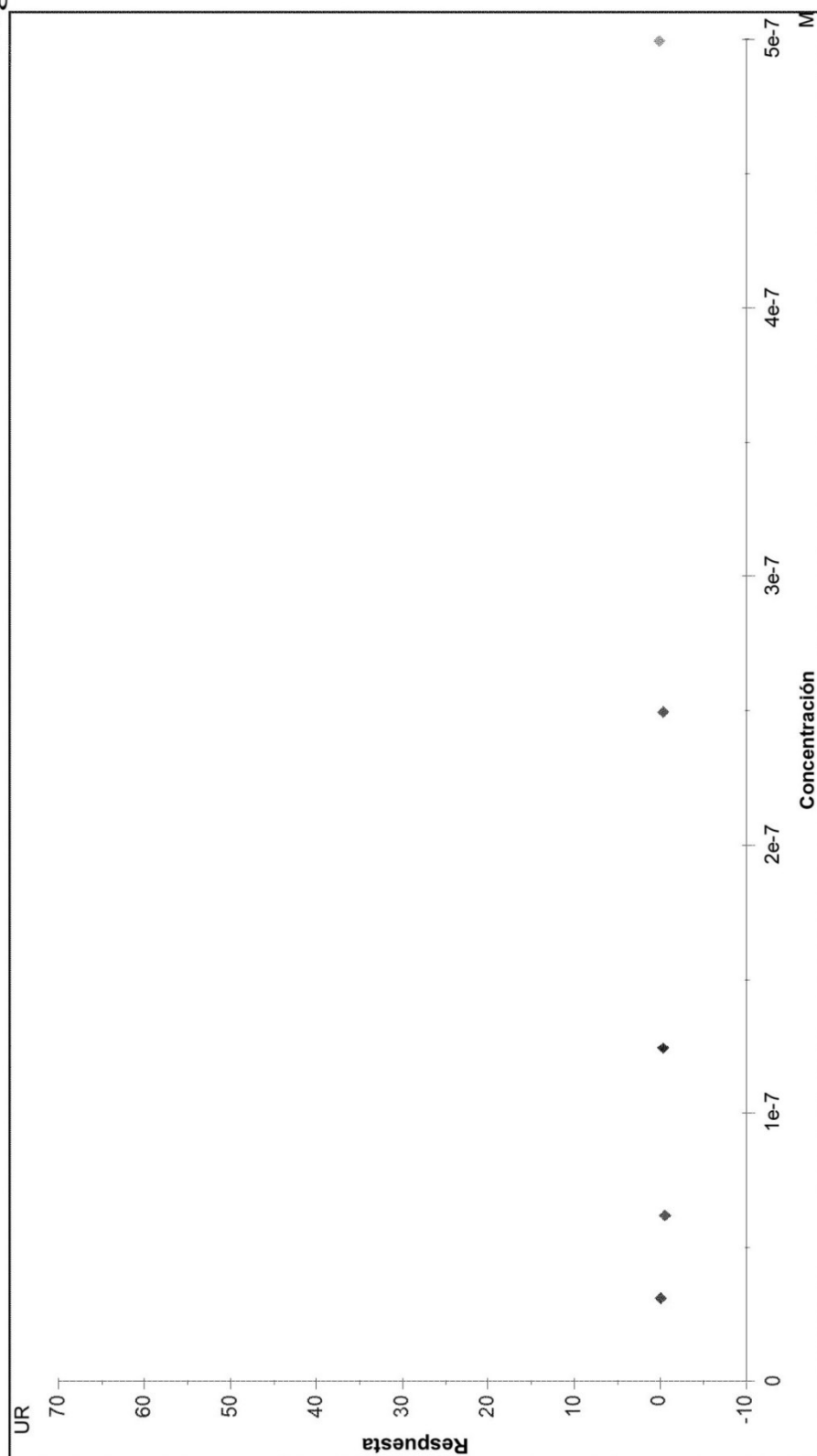


**Fig. 5B**

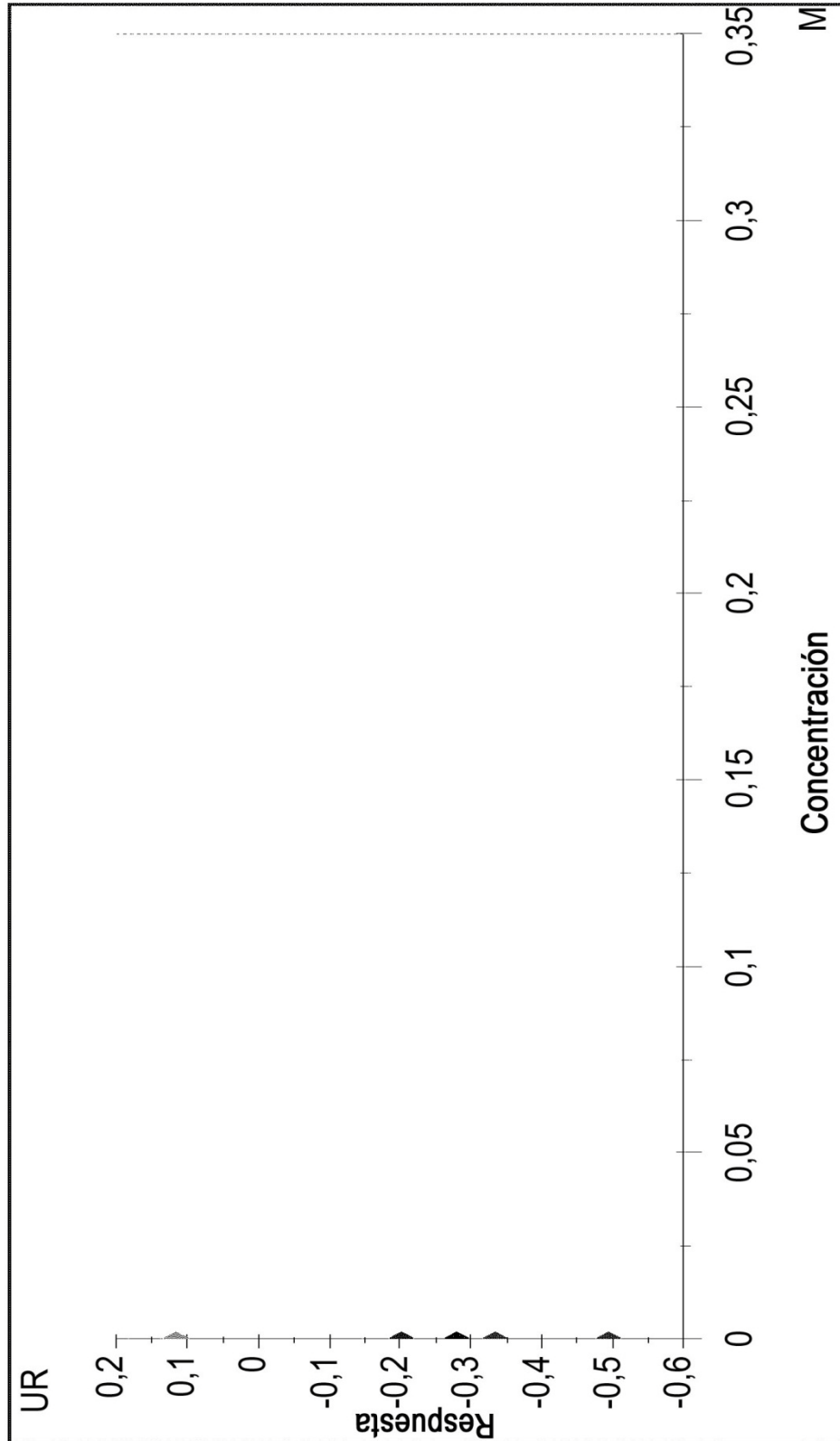
**Fig. 5C**



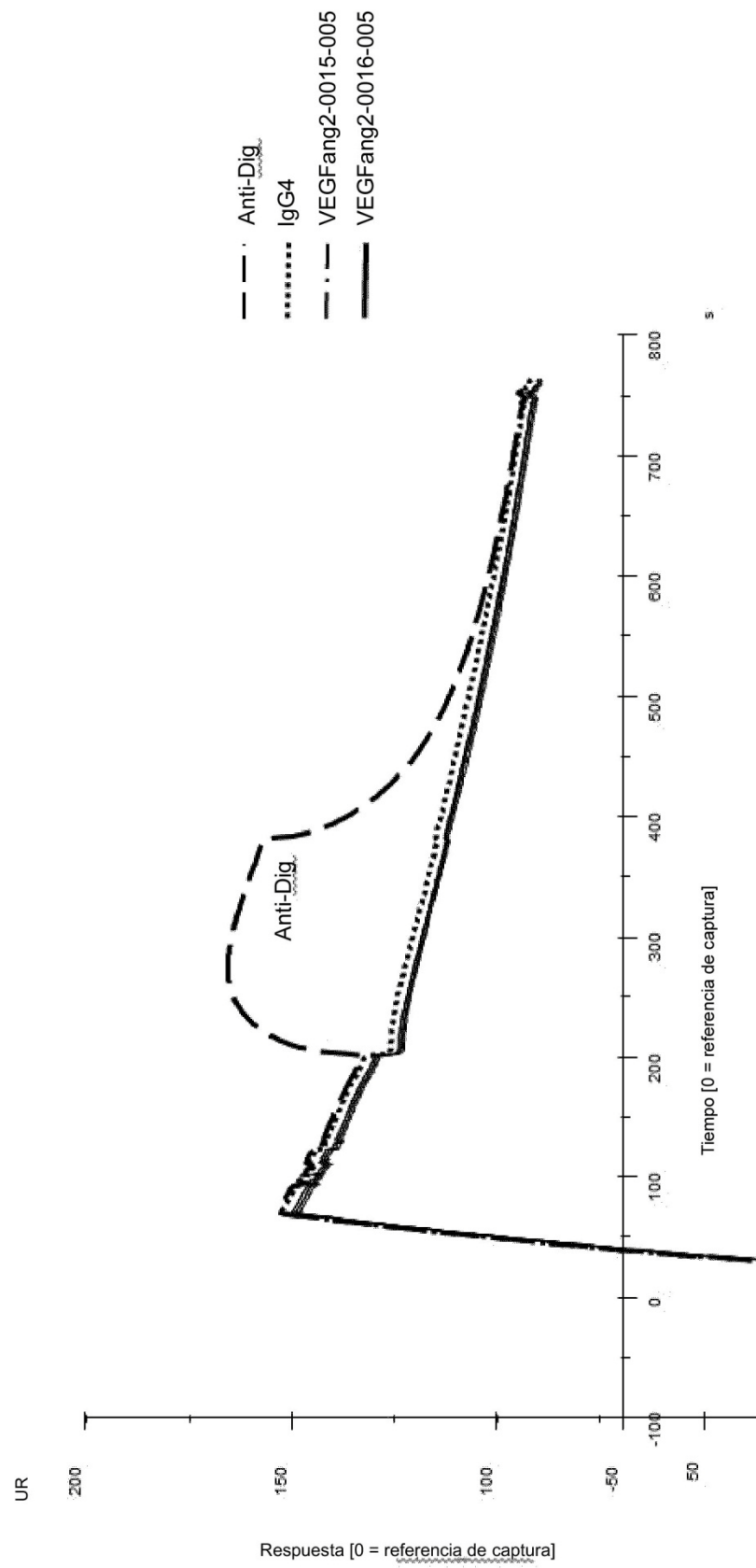
**Fig. 5D**



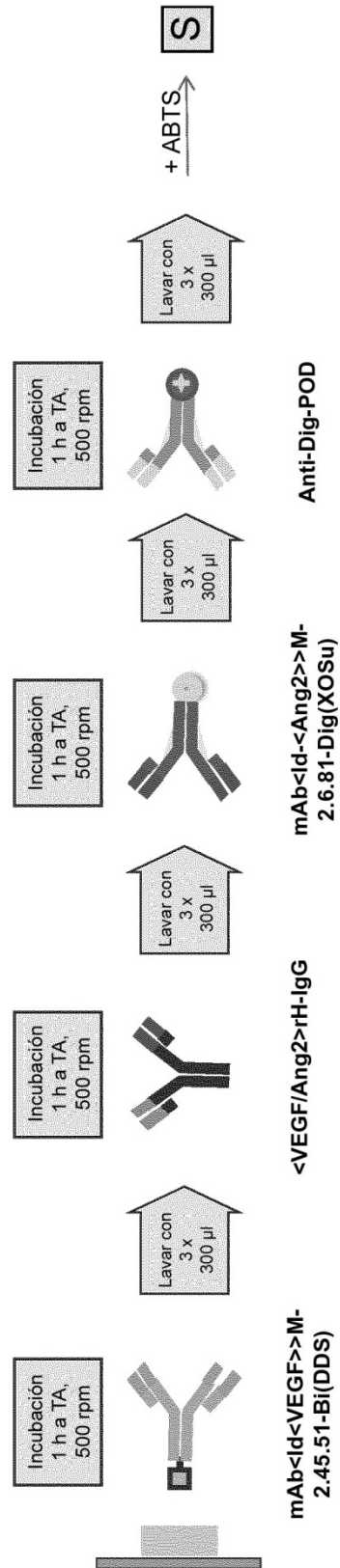
**Fig. 5E**

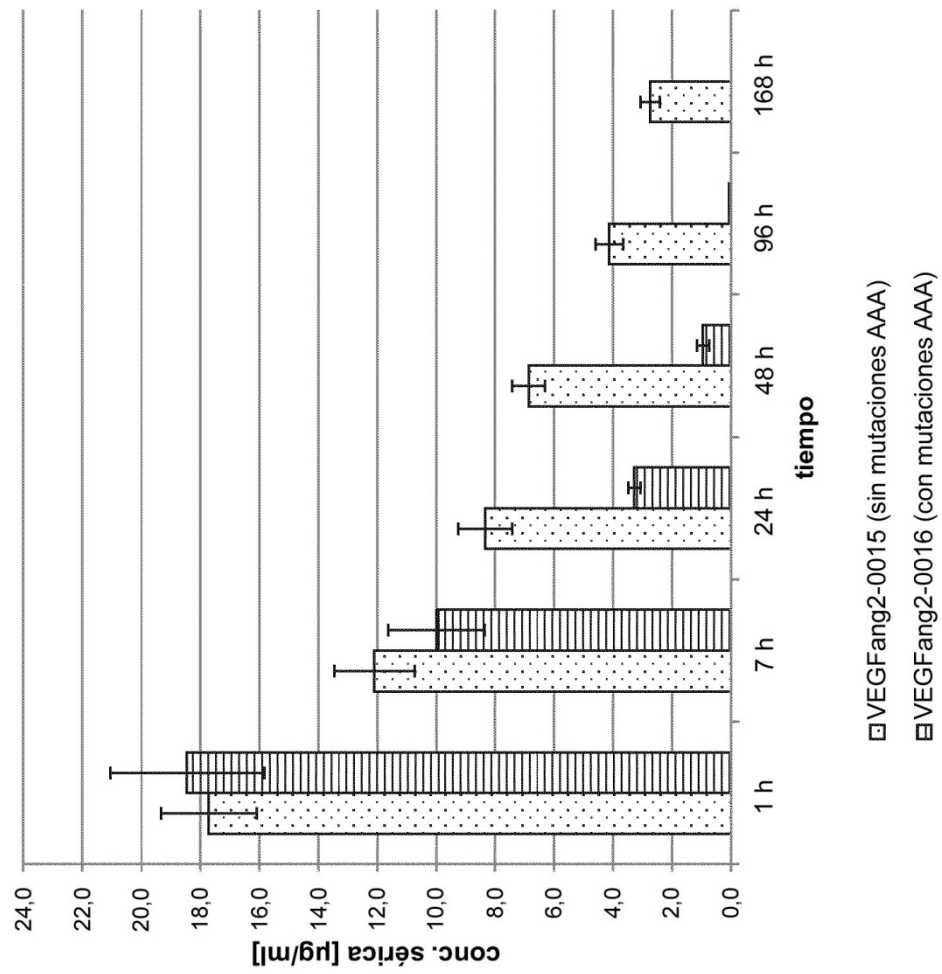


**Fig. 6**

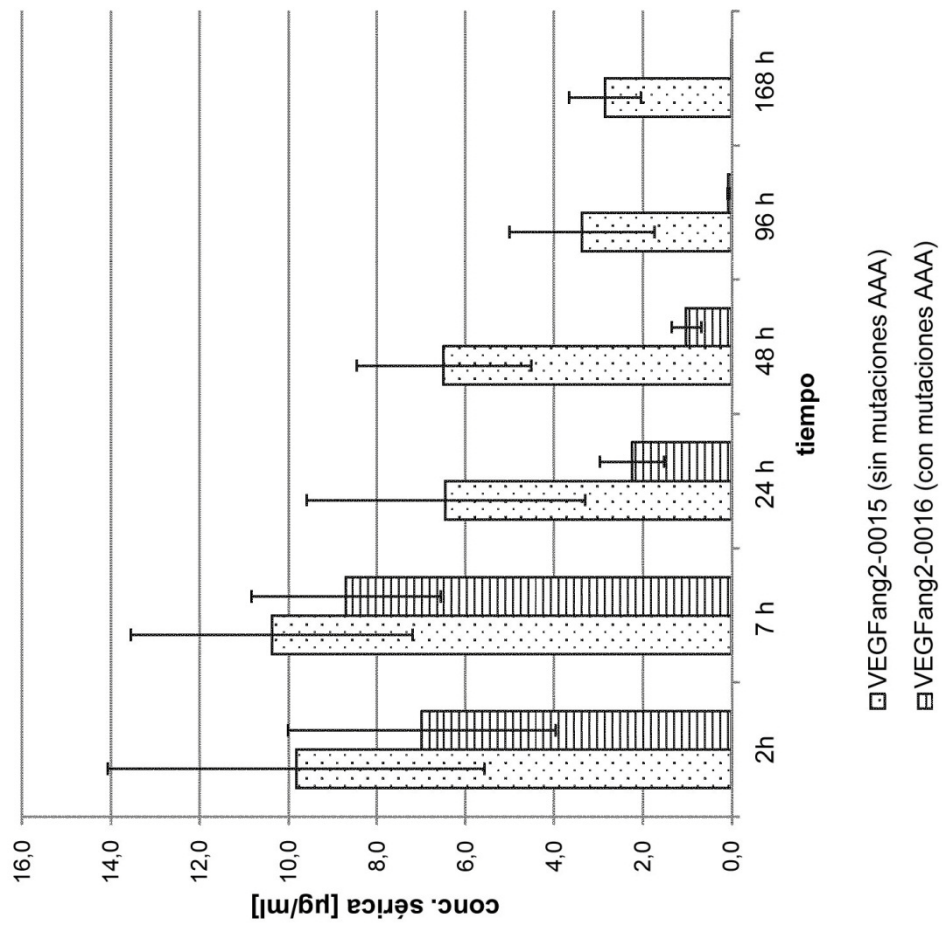


**Fig. 7A**

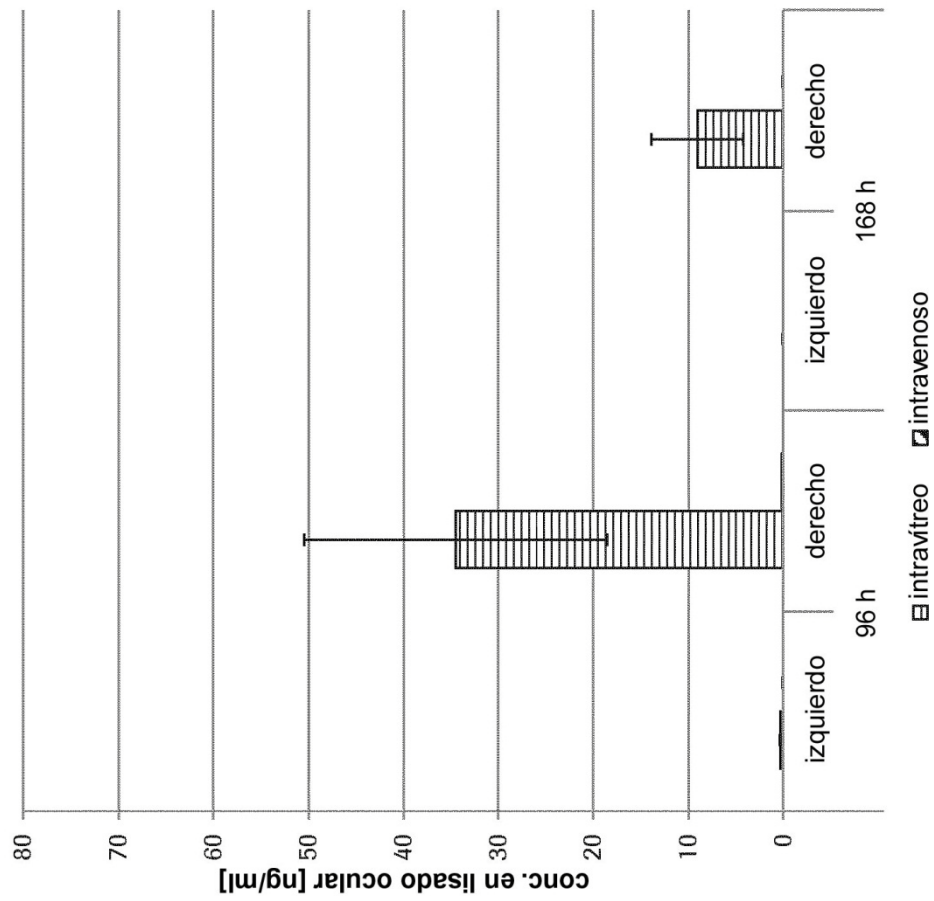


**Fig. 7B**

**Fig. 7C**



**Fig. 7D**



**Fig. 7E**

