

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 249**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/US2016/060527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17079556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16810118 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3370757**

54 Título: **Angiopoyetinas para usar en la promoción de la coagulación sanguínea y en el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

06.11.2015 US 201562252217 P

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

20.10.2021

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**DALY, CHRISTOPHER y
DAVIS, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 867 249 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

Angiopoyetinas para usar en la promoción de la coagulación sanguínea y en el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina, y se refiere al uso de las moléculas de angiopoyetina o variantes de la misma para promover la coagulación sanguínea en un sujeto que lo necesita.

10

Antecedentes

La hemorragia excesiva o la coagulación sanguínea ralentizada provocan la muerte o el debilitamiento de los pacientes. Los trastornos de la coagulación sanguínea en humanos son causados por trastornos genéticos congénitos o pueden ser un efecto secundario del tratamiento con medicamentos para otros trastornos. La pérdida de sangre puede ocurrir durante la cirugía o después de una lesión. Las lesiones son la segunda causa principal de muerte entre las personas de entre cinco y 45 años, y más de cuatro millones de personas en todo el mundo mueren a causa de lesiones cada año, a menudo debido a una gran pérdida de sangre. Las opciones de tratamiento actuales incluyen productos químicos adsorbentes (tales como zeolitas, por ejemplo, QuikClot), otros agentes hemostáticos (tales como hemostato de colágeno microfibrilar (MCH), hemostático de quitosano y estípticos), trombina, adhesivo de fibrina, desmopresina, concentrados de factor de coagulación, concentrado de complejo de protrombina, crioprecipitado, plasma congelado fresco, Factor VII recombinante y fármacos antifibrinolíticos, tales como ácido tranexámico (TXA), ácido épsilon-aminocaproico y ácido aminometilbenzoico. Los dispositivos mecánicos, tales como una pinza hemostática, se utilizan también. Sigue existiendo la necesidad de enfoques terapéuticos y preventivos eficaces para promover la coagulación sanguínea o tratar los trastornos de la coagulación sanguínea.

15

20

25

El documento WO 01/05825 divulga ácidos nucleicos que codifican angiopoyetinas humanas, los polipéptidos codificados por estos ácidos nucleicos y la aplicación de estos polipéptidos en una variedad de métodos terapéuticos.

30

Breve resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una proteína angiopoyetina AngF1-Fc-F1 para usar en métodos para estimular la coagulación sanguínea en un sujeto que lo necesita. La presente invención se basa en, en parte, en el descubrimiento de que tanto la angiopoyetina-1 (Ang1) como la angiopoyetina-2 (Ang2) se unen y modulan la función de la trombosmodulina (TM), una molécula de la superficie celular endotelial que desempeña un papel esencial como un regulador de coagulación. La TM funciona como un cofactor en la activación mediada por trombina de la proteína C, una proteína anticoagulante, y del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), un inhibidor de la disolución de los coágulos sanguíneos. Como se detalla en los Ejemplos y la discusión a continuación, tanto Ang1 como Ang2 inhibieron la activación de la proteína C y TAFI en células endoteliales cultivadas e inhibieron la unión de trombina a la TM *in vitro*. Estos resultados sugieren un papel no descrito previamente de las angiopoyetinas en la regulación de la hemostasia.

35

40

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar, prevenir o mitigar al menos un síntoma, señal o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina (i) para tratar, prevenir o mitigar al menos un síntoma, señal o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea, o (ii) en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mitigar al menos un síntoma, señal o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea.

45

50

En un aspecto de la divulgación, el trastorno de la coagulación sanguínea se selecciona del grupo que consiste en patologías plaquetarias congénitas tales como trombostenia de Glanzmann y Naegeli (trombostenia de Glanzmann), síndrome de Bernard-Soulier (complejo de glicoproteína anormal Ib-IX-V), síndrome de las plaquetas grises (gránulos alfa deficientes), deficiencia de la reserva de almacenamiento delta (gránulos densos deficientes) y enfermedad de Von Willebrand; trastornos plaquetarios provocados por una producción insuficiente, incluido el síndrome mielodisplásico u otros trastornos de la médula ósea, o por destrucción por parte del sistema inmunitario, incluida la púrpura trombocitopénica inmunitaria/PTI; trastornos del factor de coagulación tales como hemofilias que incluyen hemofilia A (deficiencia de factor VIII), hemofilia B (deficiencia de factor IX o "enfermedad de Christmas") y hemofilia C (deficiencia de factor XI, tendencia a hemorragia leve); deficiencia de vitamina K, mutaciones del Factor XII, trombocitopenia, uremia y afibrinogenemia congénita; insuficiencia hepática incluyendo aguda, crónica, inicial y terminal; y trastornos asociados con el tratamiento con warfarina, tratamiento con aspirina, cirugía y lesión.

55

60

La presente invención proporciona una proteína angiopoyetina AngF1-Fc-F1 para usar en un método de estimulación de la coagulación sanguínea, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína angiopoyetina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el sujeto se somete a cirugía. En una realización, el sujeto sufre una hemorragia debido

65

a una lesión. En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina (i) para estimular la coagulación sanguínea, o (ii) en la fabricación de un medicamento para estimular la coagulación sanguínea.

- 5 En algunos casos, la proteína angiopoyetina se administra en un sitio de lesión o en un sitio asociado con un procedimiento quirúrgico.

En varios aspectos de la divulgación de los métodos y usos descritos anteriormente, la proteína angiopoyetina de la composición farmacéutica puede tener propiedades de unión especificadas y/o comprender una proteína angiopoyetina nativa o modificada.

10 En una realización, la proteína angiopoyetina se une a un dominio extracelular soluble purificado de trombosmodulina con un valor de CE_{50} de menos de 100 nM.

- 15 En algunos aspectos de la divulgación, la proteína angiopoyetina es hAng1. En otros aspectos de la divulgación, la proteína angiopoyetina es hAng2. En la invención, la proteína angiopoyetina es una proteína angiopoyetina modificada como se define a continuación.

20 En algunos aspectos de la divulgación, la proteína angiopoyetina modificada comprende una proteína de fusión que comprende angiopoyetina-1 o un fragmento de la misma fusionado a un dominio multimerizante. En algunos casos, el dominio multimerizante es un fragmento Fc de inmunoglobulina. En un aspecto, la proteína de fusión comprende al menos un dominio de tipo fibrinógeno de angiopoyetina-1 fusionado a un fragmento Fc. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un primer dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina-1 fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un fragmento Fc y el fragmento Fc fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un segundo dominio de tipo fibrinógeno de angiopoyetina-1. En la invención, la angiopoyetina modificada es AngF1-Fc-F1. En una realización, la angiopoyetina modificada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

30 En algunos aspectos de la divulgación, la proteína angiopoyetina modificada comprende una proteína de fusión que comprende angiopoyetina-2 o un fragmento de la misma fusionado a un dominio multimerizante. En algunos casos, el dominio multimerizante es un fragmento Fc de inmunoglobulina. En un aspecto, la proteína de fusión comprende al menos un dominio de tipo fibrinógeno de angiopoyetina-2 fusionado a un fragmento Fc. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un primer dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina-2 fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un fragmento Fc y el fragmento Fc fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un segundo dominio de tipo fibrinógeno de angiopoyetina-2. En algunos casos, la angiopoyetina modificada es AngF2-Fc-F2. En un aspecto, la angiopoyetina modificada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

40 En algunos casos, la proteína angiopoyetina se administra por vía intravenosa. En algunos casos, la proteína angiopoyetina se administra por vía subcutánea.

En determinadas realizaciones, la angiopoyetina se administra en combinación con un segundo agente terapéutico o una segunda terapia.

- 45 Otras realizaciones de la presente invención resultarán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

50 Las **Figuras 1A, 1B y 1C** muestran que Ang1 y Ang2 interactúan con TM a través de sus dominios similares a fibrinógeno: La **Fig. 1A** muestra que Ang1-FD-Fc y Ang2-FD-Fc se unen de forma saturable a células COS que sobreexpresan TM; La **Fig. 1B** muestra que BowAng1 y BowAng2 se unen a los dominios extracelulares solubles de TM o Tie2; La **Fig. 1C** muestra que el dominio extracelular de Tie2 soluble compite con el dominio extracelular soluble de TM por la unión a BowAng1 o BowAng2.

55 Las **Figuras 2A, 2B, 2C, 2D y 2E** muestran que Ang1 y Ang2 inhiben la formación dependiente de TM de APC y aTAFI: La **Fig. 2A** muestra que Ang1 y Ang2 nativas inhiben la formación dependiente de TM de APC en HUVEC cultivadas; La **Fig. 2B** muestra que Ang1 nativa inhibe la formación dependiente de TM de APC, mientras que PF4 aumenta la formación dependiente de TM de APC, en HUVEC cultivadas; La **Fig. 2C** muestra que Ang1 y Ang2 nativas inhiben la formación dependiente de TM de aTAFI en HUVEC cultivadas; La **Fig. 2D** muestra que Ang1 y Ang2 nativas inhiben la formación dependiente de TM de APC en células COS que sobreexpresan TM pero que carecen de la expresión de Tie2; La **Fig. 2E** muestra que Ang1 y Ang2 nativas inhiben la formación dependiente de TM de aTAFI en células COS que sobreexpresan TM pero que carecen de la expresión de Tie2.

65 Las **Figuras 3A y 3B** muestran que la inhibición de la formación de APC por la Ang1 es independiente de Tie2: La **Fig. 3A** muestra la inhibición de la expresión de Tie2 en HUVEC infectadas con adenovirus que codifican un ARNhp

específico de Tie2; La **Fig. 3B** muestra que la Ang1 nativa inhibe la formación dependiente de TM de APC en HUVEC infectadas con adenovirus que codifican un ARNhp específico de Tie2.

Las **Figuras 4A y 4B** muestran que Ang1 y Ang2 inhiben la unión de trombina a TM: La **Fig. 4A** muestra que la Ang1 nativa inhibe la asociación de trombina con el dominio extracelular soluble de TM; La **Fig. 4B** muestra que la Ang2 nativa inhibe la asociación de trombina con el dominio extracelular soluble de TM.

Las **Figuras 5A, 5B, 5C y 5D** muestran que Ang1 está presente en las plaquetas y que se libera tras la activación: La **Fig. 5A** muestra que la Ang1 está presente en plaquetas de ratón; La **Fig. 5B** muestra que los niveles de Ang1 son mayores en el suero de ratón que en el plasma de ratón; La **Fig. 5C** muestra que los niveles de Ang1 son mayores en el plasma preparado a partir de ratones tratados con trombina en comparación con el plasma preparado de ratones no tratados; La **Fig. 5D** muestra que los niveles de Ang1 son mayores en el plasma preparado a partir de sangre recogida en el sitio de la incisión en la cola de ratones en comparación con el plasma preparado a partir de la sangre recogida por punción cardíaca en ratones (sistémica).

Las **Figuras 6A y 6B** muestran que la administración intravenosa de BowAng1 y BowAng2 a ratones promueve un rápido aumento del nivel de trombina/antitrombina circulante y de la deposición de fibrina en el pulmón: La **Fig. 6A** muestra que BowAng1 y BowAng2 promueven un aumento de la deposición de fibrina en el tejido pulmonar de ratones; La **Fig. 6B** muestra que BowAng1 y BowAng2 promueven un aumento del nivel de trombina/antitrombina circulante en ratones.

Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a métodos ni condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, una "angiopoyetina" incluye Angiopoyetina-1 (Ang1) o Angiopoyetina-2 (Ang2), a menos que se especifique de otra manera. El término "hAng1" se refiere a Ang1 humana y el término "hAng2" se refiere a Ang2 humana.

El término "CE₅₀" o "CE50", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concentración eficaz semimáxima, que incluye la concentración de un ligando que induce una respuesta, por ejemplo una respuesta celular, a mitad de camino entre la línea base y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. La CE₅₀ representa esencialmente la concentración de un ligando donde se observa un 50 % de su efecto máximo.

El término "CI₅₀" o "CI50", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concentración inhibitoria semimáxima de una respuesta celular. En otras palabras, la medida de la eficacia de un grupo particular (por ejemplo, proteína, compuesto o molécula) para inhibir la función biológica o bioquímica, en donde un ensayo cuantifica la cantidad de dicho grupo necesaria para inhibir un proceso biológico dado.

Las expresiones "angiopoyetina modificada" o "proteína angiopoyetina modificada" se refieren a angiopoyetinas recombinantes (por ejemplo, angiopoyetina expresada en un vector adenoviral; Thurston et al 2000, Nat. Med.), formas mutantes y quiméricas de angiopoyetinas y proteínas de fusión que comprenden angiopoyetina o un fragmento de la misma que se unen específicamente a trombomodulina (TM).

Las expresiones "Ang1 nativa" y "Ang2 nativa", como se utilizan en el presente documento, se refieren a Ang1 o Ang2 de longitud completa, respectivamente, sin péptido de señal N-terminal.

El término "prevenir", tal como se usa en el presente documento, se refiere a prevenir el desarrollo de un síntoma, señal o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea.

Como se utiliza en el presente documento, El término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, que presenta uno o más síntomas, señales o complicaciones de un trastorno de la coagulación sanguínea, y/o que ha sido diagnosticado con un trastorno de la coagulación sanguínea y/o tiene necesidad de mejora, prevención y/o tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea. La expresión "un sujeto que lo necesita" también puede

5 incluir, p. ej., sujetos que, antes del tratamiento, presentan (o han presentado) uno o más síntomas o señales de un trastorno de la coagulación sanguínea que incluyen, entre otros, hemorragia excesiva y tiempo de coagulación sanguínea lento.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratar", "tratando", o similares, significan aliviar un síntoma o una complicación, eliminar la causa de un síntoma o una complicación, ya sea de forma temporal o permanente, o prevenir o ralentizar la aparición de un síntoma o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea en el sujeto. En el contexto de la presente invención, los términos "tratar", "tratando", o similares, se refieren, por ejemplo, a reducir la hemorragia o reducir el tiempo necesario para coagular la sangre en un paciente que lo necesita.

10

Por la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en la materia podrá determinarla usando técnicas conocidas (véanse, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

15

20 **Métodos de tratamiento, prevención o mejora de los trastornos de la coagulación sanguínea o promoción de la coagulación sanguínea.**

Las angiopoyetinas se identificaron como ligandos para el receptor tirosina quinasa específico del endotelio, Tie2. La señalización de angiopoyetina/Tie2 influye extremadamente en los procesos angiogénicos, tanto durante el desarrollo,

25 como en el adulto, por ejemplo en la vasculatura tumoral. Las angiopoyetinas no se han implicado previamente en ningún proceso que no sea la regulación de la formación y función de los vasos sanguíneos mediante la modulación de la actividad de Tie2.

Como se muestra en el presente documento, tanto la angiopoyetina-1 (Ang1) como la angiopoyetina-2 (Ang2) se unen y modulan la función de la trombosmodulina (TM), una molécula de la superficie celular endotelial que desempeña un papel esencial como un regulador de coagulación. La TM funciona como un cofactor en la activación mediada por trombina de la proteína C, una proteína anticoagulante (Esmon, C.T., *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:7944-7947; Owen, W.G., *et al.*, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:5532-5535; Van de Wouwer, M., *et al.*, 2004, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24:1374-1383; Weiler-Guettler, H., *et al.*, 1998, *The Journal of Clinical Investigation*, 101:1983-1991; Esmon, C.T., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:2249-2252), y del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), un inhibidor de la disolución de los coágulos sanguíneos.

30

Como se ha demostrado en los ejemplos, Ang1 y Ang2 inhibieron la activación de la proteína C y TAFI en células endoteliales cultivadas e inhibieron la unión de trombina a la TM *in vitro*. La administración de trombina a ratones aumentó rápidamente los niveles plasmáticos de Ang1 y los niveles de Ang1 fueron significativamente elevados en plasma preparado a partir de la sangre de la herida. De forma adicional, la administración de una angiopoyetina modificada promovió un aumento rápido del nivel de trombina/antitrombina circulante y la deposición de fibrina en los pulmones de ratones. Estos resultados indican un papel no descrito previamente de las angiopoyetinas en la regulación de la hemostasia.

40

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, prevenir o mitigar al menos un síntoma, señal o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea. La presente invención proporciona una proteína angiopoyetina AngF1-Fc-F1 para usar en un método de estimulación de la coagulación sanguínea en un sujeto. Los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la proteína angiopoyetina modificada a un sujeto que lo necesita.

50

En diversos aspectos de la divulgación, el trastorno de la coagulación sanguínea puede incluir, pero sin limitación, patologías plaquetarias congénitas tales como trombostenia de Glanzmann y Naegeli (trombastenia de Glanzmann), síndrome de Bernard-Soulier (complejo de glicoproteína anormal Ib-IX-V), síndrome de las plaquetas grises (gránulos alfa deficientes), deficiencia de la reserva de almacenamiento delta (gránulos densos deficientes) y enfermedad de Von Willebrand. Los trastornos de la coagulación sanguínea también incluyen, pero sin limitación, trastornos plaquetarios provocados por una producción insuficiente, (p. ej., en el síndrome mielodisplásico u otros trastornos de la médula ósea) o por destrucción por parte del sistema inmunitario (púrpura trombocitopénica inmunitaria/PTI). Los trastornos de la coagulación sanguínea también incluyen, pero sin limitación, trastornos del factor de coagulación tales como hemofilias que incluyen hemofilia A (deficiencia de factor VIII), hemofilia B (deficiencia de factor IX o "enfermedad de Christmas") y hemofilia C (deficiencia de factor XI, tendencia a hemorragia leve). Los trastornos de la coagulación sanguínea también incluyen, pero sin limitación, deficiencia de vitamina K, mutaciones del Factor XII, trombocitopenia, uremia y afibrinogenemia congénita. Las deficiencias en la coagulación sanguínea también pueden estar asociadas con insuficiencia hepática (formas aguda y crónica, insuficiencia hepática temprana), insuficiencia hepática terminal).

60

La hemorragia o hemorragia excesiva también puede estar asociada con el tratamiento de un paciente con warfarina

65

o aspirina, o puede producirse durante la cirugía o después de una lesión. En realizaciones particulares, se contempla la promoción de la coagulación sanguínea en un sitio de lesión o cirugía.

5 La presente invención incluye una angiopoyetina AngF1-Fc-F1 para usar en métodos de estimulación de la coagulación sanguínea, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la proteína angiopoyetina modificada a un sujeto que lo necesita, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto en una dosis única, o en múltiples dosis, p. ej., como parte de una pauta posológica terapéutica específica. Por ejemplo, la pauta posológica terapéutica puede comprender administrar múltiples dosis de la composición farmacéutica al sujeto con una frecuencia de aproximadamente una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses o con menos frecuencia. En algunas realizaciones, la pauta posológica terapéutica comprende administrar múltiples dosis de la composición farmacéutica al sujeto con una frecuencia de aproximadamente una vez al día, aproximadamente 2 veces al día, aproximadamente 3 veces al día o más de 4 veces al día.

En determinadas realizaciones la proteína angiopoyetina modificada se administra por vía subcutánea, intravenosa, intracraneal, intraventricular, o se administra sistémicamente en un vector adenoviral a un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones la proteína angiopoyetina modificada se administra en un sitio de lesión o en un sitio asociado con un procedimiento quirúrgico. En una realización, la administración en un sitio de lesión o cirugía es mediante inyección. En algunos casos, la administración en un sitio específico de la proteína angiopoyetina o de la proteína angiopoyetina modificada da como resultado una alta concentración relativa de angiopoyetina en el sitio para promover la coagulación sanguínea. En una realización, la "alta concentración relativa" se mide frente a los niveles plasmáticos de angiopoyetina, y puede ser, por ejemplo, mayor de 10 nM, mayor de 50 nM o mayor de 100 nM.

25 **Angiopoyetinas modificadas**

La presente invención comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición terapéutica que comprende una angiopoyetina modificada.

30 Los ejemplos no limitantes de categorías de angiopoyetinas modificadas incluyen angiopoyetinas recombinantes (por ejemplo, angiopoyetina expresada en un vector adenoviral; Thurston et al 2000, Nat. Med.), formas mutantes y quiméricas de angiopoyetinas y proteínas de fusión que comprenden angiopoyetina o un fragmento de la misma que se unen específicamente a trombomodulina (TM).

35 De acuerdo con determinados aspectos ilustrativos de la divulgación, la angiopoyetina modificada es una proteína de fusión que comprende uno o más dominios de la molécula de angiopoyetina fusionada a un dominio multimerizante. En términos generales, el o los dominios multimerizantes funcionan conectando los diversos componentes de la molécula de angiopoyetina (por ejemplo, los dominios de tipo fibrinógeno) entre sí. Como se utiliza en el presente documento, un "dominio multimerizante" es cualquier macromolécula que tiene la capacidad de asociarse (covalente o no covalentemente) con una segunda macromolécula de estructura o constitución igual o similar. Por ejemplo, un dominio multimerizante puede ser un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_{H3}. Un ejemplo no limitante de dominio multimerizante es una fracción Fc de una inmunoglobulina, p. ej., un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo. En ciertos aspectos de la divulgación, el dominio multimerizante es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un resto de cisteína. En otros aspectos de la divulgación, el dominio multimerizante es un resto de cisteína o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios multimerizantes incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo de bucle de hélice o un motivo de hélice superenrollada.

50 En ciertos aspectos de la divulgación, la angiopoyetina modificada es una proteína de fusión que comprende uno o más dominios similar a fibrinógeno de la molécula de angiopoyetina-1 fusionada al fragmento Fc de una inmunoglobulina que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos, como se establece en la patente de Estados Unidos N.º 7.008.781. En determinados aspectos ilustrativos de la divulgación, la proteína de fusión que se puede usar en el contexto de los métodos comprende un primer dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un fragmento Fc de IgG y el extremo C-terminal del fragmento Fc fusionado al extremo N-terminal de un segundo dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina (Davis, S., et al, 2003; Nat. Struct. Biol. 10:38-44), en donde la angiopoyetina puede ser Ang1 o Ang2. La presente invención comprende el uso de la angiopoyetina modificada denominada y conocida en la técnica como AngF1-Fc-F1. En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada es un dímero que comprende dos AngF1-Fc-F1s que se asocian mediante asociación intramolecular de los fragmentos Fc (también denominados BowAng1, como se divulga en Davis, 2003, *supra*). De acuerdo con determinadas realizaciones, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. De acuerdo con determinados aspectos ilustrativos de la divulgación, los métodos de la presente divulgación comprenden el uso de la angiopoyetina modificada denominada y conocida en la técnica como AngF2-Fc-F2. En determinados aspectos, la angiopoyetina modificada es un dímero que comprende dos AngF2-Fc-F2s que se asocian mediante asociación intramolecular de los fragmentos Fc (también denominados BowAng2,

como se divulga en Davis, 2003, *supra*). En algunos aspectos, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. BowAng1 y BowAng2 contienen el dominio de fibrinógeno Ang1 o Ang2 seguido del dominio de Fc humano y otro dominio de fibrinógeno, de modo que tras la dimerización mediada por Fc, las proteínas contienen 4 dominios de fibrinógeno de angiopoyetina (Davis, 2003, *supra*).

5 Otras angiopoyetinas modificadas que se pueden usar en el contexto de los métodos de la presente divulgación incluyen cualquiera de las moléculas de angiopoyetina modificadas expuestas en las patentes de Estados Unidos números 6265564, 6441137 y 6825008.

10 La presente divulgación incluye angiopoyetinas modificadas que unen un dominio extracelular soluble purificado de TM con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM, medido mediante un ensayo de unión *in vitro*, p. ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento (p.ej., evaluando la capacidad de las angiopoyetinas modificadas para unirse al dominio extracelular soluble purificado de TM), o un ensayo sustancialmente similar. En determinados casos, la angiopoyetina modificada de la presente divulgación se une al dominio extracelular soluble purificado de TM, con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM o 10 nM medido mediante un ensayo *in vitro*, p. ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento (p.ej., evaluando la capacidad de las angiopoyetinas modificadas para unirse al dominio extracelular soluble purificado de TM), o un ensayo sustancialmente similar.

20 La presente divulgación incluye angiopoyetinas modificadas que inhiben la formación de APC en HUVEC cultivadas con una CI₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM medida en un ensayo basado en células, p. ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 en el presente documento (p.ej., evaluando la capacidad de las angiopoyetinas modificadas para inhibir la formación de APC en HUVEC cultivadas), o un ensayo sustancialmente similar. En ciertos aspectos de la divulgación, las angiopoyetinas modificadas de la presente divulgación inhiben la formación de APC en HUVEC cultivadas con una CI₅₀ de menos de aproximadamente 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM o 10 nM medido mediante un ensayo basado en células, p. ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 en el presente documento (p.ej., evaluando la capacidad de las angiopoyetinas modificadas para inhibir la formación de APC en HUVEC cultivadas), o un ensayo sustancialmente similar.

30 **Composiciones farmacéuticas**

La presente invención implica la administración de una proteína angiopoyetina modificada a un sujeto en el que la proteína angiopoyetina modificada está contenida dentro de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con vehículos (p.ej., vehículos farmacéuticamente aceptables), excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia adecuada, administración, tolerancia, y similares. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido para todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

45 Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y vías orales. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos.

Una composición farmacéutica puede administrarse por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Adicionalmente, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo inyector de pluma tiene fácilmente aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica. Tal dispositivo inyector de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo inyector de pluma reutilizable usa generalmente un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo inyector de pluma puede entonces reutilizarse. En un dispositivo inyector de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo inyector de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, el dispositivo completo se desecha.

65 En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede entregarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba. En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase,

Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1984, CRC Press, Boca Ratón, Florida. Incluso en otra realización, puede ubicarse un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana de la composición, siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, páginas 115-138). Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, p. ej., disolviendo, suspendiendo o emulsionando la proteína angiopoyetina o la proteína angiopoyetina modificada descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso utilizado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros coadyuvantes, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, p. ej., aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección preparada de este modo se carga preferentemente en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para su uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, pastillas, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

25 Dosificación

La cantidad de proteína angiopoyetina modificada (AngF1-Fc-F1) administrada a un sujeto de acuerdo con el método es, generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de proteína angiopoyetina o proteína angiopoyetina modificada que da como resultado una reducción en la gravedad o duración de un síntoma, señal o complicación de un trastorno de la coagulación sanguínea, o promueve la coagulación sanguínea.

En el caso de una proteína angiopoyetina o una proteína angiopoyetina modificada, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 600 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1,0 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 510 mg, aproximadamente 520 mg, aproximadamente 530 mg, aproximadamente 540 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 560 mg, aproximadamente 570 mg, aproximadamente 580 mg, aproximadamente 590 mg, o aproximadamente 600 mg, de la proteína angiopoyetina o proteína angiopoyetina modificada.

La cantidad de la proteína angiopoyetina o proteína angiopoyetina modificada contenida en las dosis individuales puede expresarse en términos de miligramos de proteína por kilogramo de peso corporal del sujeto (es decir, mg/kg). Por ejemplo, la angiopoyetina modificada se puede administrar a un sujeto a una dosis de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente. En determinadas realizaciones, la proteína angiopoyetina modificada se administra a un sujeto que la necesita a una dosis de aproximadamente 5 a 25 mg/kg del peso corporal del sujeto.

60 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso

molecular es peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1. La trombomodulina se une a Ang1-FD-Fc en un estudio de clonación de expresión

5 Se construyeron bibliotecas de expresión de ADNc en el vector de expresión pJFE con ARNm aislado de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y de la línea celular de tipo endotelial EA.hy926, usando un kit (Invitrogen). Las bibliotecas se transfectaron en placas de células COS y se analizaron como en Davis, S., *et al.*, (1994; Science. 266:816-819) con la molécula quimérica Ang1-FD-Fc, que consiste en el dominio de tipo fibrinógeno de unión a Tie2 (FD) de Ang1 fusionado con una etiqueta Fc humana (Davis, 2003, *supra*, SEQ ID NO:5) a una concentración de 1 µg/ml. Se recogieron las células teñidas y el ADN plasmídico extraído de ellas se enriqueció progresivamente hasta que se obtuvieron clones aislados. De los ocho clones independientes, uno de los ADNc asociados codificados para Tie2, y los otros siete clones, que solo difieren en la longitud de las regiones no traducidas, contenían ADNc que codifica trombomodulina (TM), una proteína de la superficie celular altamente expresada en células endoteliales (Esmon, 1981, *supra*). Solo se tiñeron células raras en placas de células COS transfectadas con biblioteca, lo que indica que la unión de Ang1-FD-Fc a Tie2 y TM es altamente específica.

Ejemplo 2. Ang1-FD-Fc y Ang2-FD-Fc se unen de forma saturable a células COS que sobreexpresan TM

20 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de Ang1-FD-Fc y Ang2-FD-Fc para unirse a células COS que sobreexpresan TM. Se transfectaron células COS en placas de 48 pocillos con un vector de expresión que contenía TM, o con un vector vacío como control. Dos días después de la transfección, las células se incubaron con 0, 0,16, 0,4, 1, 2,56, 6,4, 16, 40 o 100 nM de Ang1-FD-Fc (SEQ ID NO: 5; restos 1-15 que corresponden al péptido señal) o Ang2-FD-Fc (SEQ ID NO: 6; restos 1-15 que corresponden al péptido señal) en 200 µl de tampón de unión (PBS/suero de ternera al 10 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, las células se fijaron en MeOH frío, seguido de incubación con tampón de unión que contenía anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (una dilución 1:1000 de anti-Fc humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Promega)) durante 30 min. Después de dos lavados con PBS más, se añadieron 200 µl de sustrato PNPP (Sigma). Las reacciones se detuvieron después de 5 min mediante la adición de 50 µl de NaOH 3 N, y la DO405 se tomó como una medida de la unión. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado. Hubo una variabilidad significativa en estas mediciones, probablemente una consecuencia de los efectos de la avidéz resultantes de las eficiencias de transfección variables. Se observó cierta unión inespecífica de Ang1-FD-Fc a las células transfectadas con vector vacío a concentraciones elevadas, pero fue menos del 20 % de unión a las células que expresan TM.

35 La unión específica, dada en unidades de DO405, se define como la diferencia entre la unión a células COS transfectadas con TM y la unión a células COS transfectadas con vector vacío. Tanto Ang1-FD-Fc como Ang2-FD-Fc, pero no una proteína de Fc de control, se unieron de manera saturable a las células COS que sobreexpresan TM (Fig. 1A), con afinidades de unión aparentes de ~88 nM para Ang1-FD-Fc y ~8,3 nM para Ang2-FD-Fc.

40 Se evaluó la capacidad de un triple mutante de Ang2-FD-Fc que no se une a Tie2 (Barton, W.A. *et al.*, 2005, Structure, 13:825-832; SEQ ID NO:7; los restos 1-15 corresponden al péptido señal) para unirse a células COS que sobreexpresan TM. En el triple mutante de Ang2-FD-Fc, los restos mutados (F468A/Y474A/Y475A) están localizados en la interfaz Ang2/Tie2 (Barton, W.A., 2006, Nat. Struct. Mol. Biol. 13:524-532). En experimentos de tinción (como se describe en el Ejemplo 1), no se observó la unión del triple mutante de Ang2-FD-Fc a células COS que sobreexpresan TM. Esta observación proporciona más apoyo a la idea de que los restos en la interfaz de unión angiopoyetina/Tie2 también son necesarios para la unión a TM.

Ejemplo 3. BowAng1 y BowAng2 se unen al dominio extracelular purificado soluble de TM

50 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de las angiopoyetinas quiméricas BowAng1 (SEQ ID NO: 2) y BowAng2 (SEQ ID NO: 4) para asociarse con el dominio extracelular soluble purificado de TM.

Se incubó el dominio extracelular soluble de la TM humana (R&D Systems) o el dominio extracelular soluble de Tie2 humano (producido en Regeneron; SEQ ID NO: 9) a 100 nM con BowAng1 o BowAng2 a 100, 250 o 500 nM o con proteína de control de Fc humano 500 nM en tampón de unión (NaCl 0,15 M, Tris 20 mM, pH 7,5, CaCl₂ 2 mM, Triton X-100 0,1 %, 1 mg/ml de BSA) en hielo durante 60 minutos. Después de la incubación, BowAng1, BowAng2 o Fc humano se precipitaron mediante incubación con 25 µl de perlas de proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) durante 60 minutos. A continuación, las perlas se lavaron con tampón de unión y las proteínas se eluyeron calentando en tampón de muestra SDS y luego se resolvieron en un gel SDS. La coprecipitación de TM y Tie2 se evaluó mediante transferencia Western con un anticuerpo monoclonal anti-TM (Santa Cruz Biotechnology (D-3), usado en una dilución 1:500) o un anticuerpo monoclonal anti-Tie2 (clon 33.1, Peters, K.G. *et al.*, 1998, British Journal of Cancer, 77:51-56).

65 Como control positivo, se evaluó la unión de BowAng1 y BowAng2 al dominio extracelular soluble de Tie2. Tanto BowAng1 como BowAng2, pero no una proteína control (Fc humano), asociados con TM, con valores de CE50 estimados en los cientos de nM (Fig. 1B). De acuerdo con el ensayo de unión a la superficie celular, BowAng2 se unió a TM significativamente más fuertemente que BowAng1 (Fig. 1B). Dado que la TM soluble es monomérica, este ensayo

proporciona una medida de las interacciones monómero-monómero entre la TM y un dominio similar al fibrinógeno de BowAng1 o BowAng2. Por tanto, está libre de efectos de avidéz inherentes a la unión de formas diméricas de angiopoyetinas a la TM de la superficie celular (Fig. 1A), por lo que no es inesperado que se observen afinidades aparentes más bajas. La afinidad aparente relativamente baja de las angiopoyetinas por Tie2 monomérico observada aquí (valores estimados de CE50 en cientos de nM) concuerda con los efectos de avidéz previamente descritos que son característicos de la unión de angiopoyetina-Tie2 (Davis, 2003, *supra*).

Los experimentos de coprecipitación no lograron ofrecer evidencia de la existencia de la formación de complejos sobre la superficie de las células que incluyen tanto Tie2 como TM (datos no mostrados).

Ejemplo 4. El dominio extracelular de Tie2 soluble compite con TM por la unión a BowAng1 y BowAng2

En este ejemplo, se evaluó la capacidad del dominio extracelular de Tie2 soluble para competir con el dominio extracelular de TM soluble por unirse a BowAng1 y BowAng2.

BowAng1 o BowAng2 100 nM se incubó con dominio extracelular soluble de TM humana (R&D Systems; 100 nM) en ausencia o presencia en exceso (2 μ M) de dominio extracelular soluble de Tie2 humano (producido en Regeneron) en tampón de unión (NaCl 0,15 M, Tris 20 mM pH 7,5, CaCl₂ 2 mM, Triton X-100 0,1 %, 1 mg/ml de BSA) en hielo durante 60 minutos. Después de la incubación, BowAng1 o BowAng2 se precipitaron mediante incubación con 25 μ l de perlas de proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) durante 60 minutos. A continuación, las perlas se lavaron con tampón de unión y las proteínas se eluyeron calentando en tampón de muestra SDS y luego se resolvieron en un gel SDS. La coprecipitación de TM y Tie2 se evaluó mediante transferencia Western con un anticuerpo monoclonal anti-TM (Santa Cruz Biotechnology (D-3), usado a una dilución de 1:500) o un anticuerpo monoclonal anti-Tie2 (clon 33.1 (Peters, *supra*).

Como se muestra en la figura 1C, Tie2 compitió con TM por la unión a BowAng1 y BowAng2, lo que sugiere que los sitios de unión de las angiopoyetinas para TM y Tie2 se superponen. Sin embargo, Tie2 fue menos eficaz en competir con TM por la unión a BowAng2, de acuerdo con la observación de que BowAng2 parece unir TM más fuertemente que BowAng1, aunque se une con menos fuerza que BowAng1 a Tie2 en este ensayo de unión en solución (Fig. 1B).

Ejemplo 5. Ang1 y Ang2 nativas inhiben la formación de APC y TAFI en HUVEC cultivadas

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de las angiopoyetinas para modular la activación dependiente de trombina/TM de la proteína C y TAFI. La adición de proteína C o TAFI a células endoteliales cultivadas en presencia de trombina da como resultado la escisión de estos sustratos de una manera dependiente de TM (Hackeng, T.M. *et al.*, 1996, *The Biochemical Journal*. 319 (Pt 2):399-405; Hockin, M.F., *et al.*, 1997, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17:2765-2775; Slungaard, A. *et al.*, 2003, *Blood*. 102:146-151). Varios estudios anteriores han utilizado células endoteliales cultivadas para evaluar los efectos de diversas proteínas (p. ej., el factor plaquetario 4 (PF4)) de las proteínas del gránulo α de las plaquetas sobre la actividad del complejo trombina/TM (Slungaard, *supra*).

La formación de APC en monocapas de HUVEC se evaluó utilizando una versión modificada de un método descrito anteriormente (Slungaard, *supra*). Se sembraron 50.000 HUVEC (VEC Technologies) en placas de 48 pocillos en 200 μ l de medio completo MCDB131. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con tampón de reacción (HBSS + HEPES 10 mM pH 7,4 + 1 mg/ml de BSA) y luego se incubaron durante 60 min a 37 °C con 100 μ l de tampón de reacción que contenía 0,2 μ M de proteína C (Enzyme Research Labs), trombina 0,1 U/ml (Sigma) y Ang1 humana nativa (R&D Systems), Ang2 humana nativa (R&D Systems), PF4 humano (R&D Systems) o una proteína que contiene Fc de control a 1, 10, 50, 100, 500 o 1000 nM. Después de la incubación, los sobrenadantes celulares (90 μ l de tampón de cada pocillo) se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se incubaron con el inhibidor de trombina hirudina (Sigma) a 25 U/ml durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió el sustrato cromogénico de APC S-2366 (Chromogenix) a 0,2 mM y se siguió la escisión de S-2366 controlando el cambio en la DO a 405 nm. La DO a 405 nm a ~10 minutos después de la adición de S-2366 (la DO a 405 nm seguía aumentando linealmente en este momento) se utilizó para evaluar los niveles relativos de formación de APC dependiente de TM en cada muestra (después de restar el valor observado cuando el procedimiento se realizó sin HUVEC en los pocillos).

El gráfico de la Fig. 2A representa las cantidades relativas de formación de APC (en comparación con la formación de APC en presencia de la proteína de control) como función de la concentración de angiopoyetina. Las barras de error representan la DE, n = 3. Tanto Ang1 como Ang2 inhibieron sustancialmente la formación de APC (en relación con la cantidad generada en presencia de 1 μ M de una proteína de control), con valores de CI₅₀ en los cientos de nM (Fig. 2A). De acuerdo con su mayor afinidad por TM, Ang2 fue un inhibidor más potente de la producción de APC que Ang1 (Fig. 2A).

Como control adicional de la especificidad del ensayo, se evaluó el efecto de PF4 sobre la formación de APC en HUVEC. Las HUVEC se incubaron con proteína C y trombina más una proteína de control (0,5 μ M), Ang1 nativa (0,5 μ M) o PF4 (10 μ g/ml, ~1,3 μ M) durante 60 minutos y a continuación se analizaron los sobrenadantes celulares para determinar los niveles de APC. El gráfico de la Fig. 2B representa las cantidades relativas de APC generada (a la cantidad de APC generada en presencia de la proteína de control se le asignó un valor de 1,0). Las barras de error

representan la DE, n = 3. Los niveles relativos de APC en los grupos de tratamiento con Ang1 y PF4 fueron significativamente diferentes del grupo de control (***, P < 0,001, ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples). Al contrario que las angiopoyetinas, la adición de PF4 a las HUVEC aumentó ligeramente la formación de APC (Fig. 2B), como se ha demostrado previamente (Slungaard, *supra*).

Se evaluó la capacidad de angiopoyetinas para afectar una formación aTAFI en HUVEC. Se sembraron 50.000 HUVEC (VEC Technologies) en placas de 48 pocillos en 200 µl de medio completo MCDB131. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con tampón de reacción (HBSS + HEPES 10 mM pH 7,4 + 1 mg/ml de BSA) y a continuación se incubaron durante 60 min a 37 °C con 100 µl de tampón de reacción que contenía 0,2 µM de TAFI (Enzyme Research Labs), 1 U/ml de trombina y Ang1 humana nativa (1 nM o 100 nM), Ang2 humana nativa (1 nM o 100 nM) o una proteína que contenía Fc de control (1 mM). Después de la incubación, se usaron sobrenadantes celulares para medir la actividad de aTAFI usando el ensayo fluorogénico ACTIFLUOR TAFIa Activitiy Assay (American Diagnostica).

El gráfico de la Fig. 2C representa las cantidades relativas de aTAFI generado (a la cantidad de aTAFI generado en presencia de la proteína de control se le asignó un valor de 1,0). Las barras de error representan la DE, n = 3. Los niveles relativos de aTAFI en los grupos de tratamiento con Ang1 100 nM y Ang2 100 nM fueron significativamente diferentes de los del grupo de control (***, P < 0,001, ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples). De forma similar a su efecto sobre la formación de APC, Ang1 y Ang2 nativas a 100 nM inhibieron significativamente la formación de aTAFI en HUVEC (Fig. 2C).

Estos experimentos indican que además de la unión a TM, Ang1 y Ang2 nativas inhiben la función de TM en células endoteliales.

Ejemplo 6. Ang1 y Ang2 inhiben tanto la formación de APC como de aTAFI en células COS que sobreexpresan TM pero que carecen de la expresión de Tie2 (la inhibición no requiere Tie2)

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de Ang1 y Ang2 para inhibir la formación de APC y aTAFI en células COS que sobreexpresan TM pero que carecen de la expresión de Tie2.

Se sembraron células COS7 transfectadas con vectores de expresión para TM o vector vacío de control, un día después de la transfección, en placas de 48 pocillos (~80.000/pocillo). Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con tampón de reacción (HBSS + HEPES 10 mM + 1 mg/ml de BSA) y a continuación se incubaron con 100 µl de tampón de reacción que contenía 1, 3, 9, 27, 81, 243 o 729 nM de Ang1 o Ang2 humana nativa durante 30 minutos a 4 °C. A continuación se añadieron 0,2 µM de proteína C y 0,1 U/ml de trombina y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se detuvo la reacción con hirudina y se determinaron los niveles de APC, como anteriormente.

Después de la incubación, se transfirieron 90 µl de tampón de cada pocillo a una placa de 96 pocillos y se incubaron con el inhibidor de trombina hirudina (Sigma) a 25 U/ml durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió el sustrato cromogénico de APC S-2366 (Chromogenix) a 0,2 mM y se siguió la escisión de S-2366 monitorizando el cambio en la DO a 405 nm. La DO a 405 nm a ~10 minutos después de la adición de S-2366 (la DO a 405 nm seguía aumentando linealmente en este momento) se utilizó para evaluar los niveles relativos de formación de APC dependiente de TM en cada muestra (después de restar el valor observado cuando el procedimiento se realizó sin HUVEC en los pocillos). El gráfico de la Fig. 2D representa la formación relativa de APC en función de la concentración de angiopoyetina (a la cantidad formada en ausencia de angiopoyetina se le asignó un valor de 1,0).

Se evaluó la capacidad de las angiopoyetinas para afectar a la formación de aTAFI en células COS. Las células COS transfectadas con vectores de expresión para TM o vector vacío de control en placas de 10 cm se lavaron en PBS, se recogieron usando una espátula, se desagregaron por trituración, y se granularon. Las células se resuspendieron en tampón de reacción (HBSS + HEPES 10 mM pH 7,4 + 1 mg/ml de BSA, ~80.000 células/reacción) y se incubaron con 72 µl de tampón de reacción que contenía diversas concentraciones de Ang1 o Ang2 humana nativa (1, 3, 9, 27, 81, 243 o 729 nM) durante 30 minutos a 4 °C. Tras esto, se añadieron 0,2 µM de TAFI y 1 U/ml de trombina en un volumen final de 80 µl y se incubaron durante 30 minutos a 22 °C. A continuación, se sedimentaron las células y se transfirieron 75 µl de los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 25 µl de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) 2 mM (Sigma) y 50 µl de un sustrato TAFI liberador de tiol (reactivo R2, Pefakit TAFI, Pentapharm) y se utilizó la DO a 405 nm a 10 minutos para determinar la actividad TAFI. El gráfico de la Fig. 2E representa la formación de aTAFI en relación con la cantidad generada en ausencia de angiopoyetina.

En células COS que sobreexpresan TM, pero que carecen de expresión de Tie2, las angiopoyetinas inhibieron significativamente la formación de APC y aTAFI, lo que indica que la inhibición no requiere Tie2 (Fig. 2D y 2E). Al contrario de su efecto en las HUVEC, se observó inhibición mediada por angiopoyetina en células COS incluso a concentraciones bajas de nM, lo que presumiblemente refleja la mayor unión de angiopoyetina a TM sobreexpresada impulsada por la avidéz. Una posible explicación de esta observación es que en las HUVEC, el receptor de proteína C endotelial (EPCR) hace que el bloqueo de la formación de APC sea más difícil que en las células COS. EPCR se expresa en niveles altos en HUVEC y se une a la proteína C con alta afinidad (40), promoviendo la transferencia de proteína C al complejo trombina/TM, amplificando así su actividad (41). En este contexto, es interesante señalar que,

al contrario que las HUVEC, el EPCR se expresa en niveles bajos en la microvasculatura (Laszik Z., *et al.*, 1997, *Circulation*. 96:3633-3640).

5 Ejemplo 7. La inhibición de la formación de APC por Ang1 es independiente de Tie 2

En este ejemplo, se evaluó el efecto de anular la expresión de Tie2 sobre la inhibición dependiente de Ang1 de la formación de APC en HUVEC. Las HUVEC se infectaron con adenovirus (~ 30 ufp/célula) que codifican un ARNhp de control no silenciador o un ARNhp específico de Tie2 como se describe (Daly, C. *et al.*, 2004, *Genes & Development*. 18:1060-1071).

10 La secuencia del ARNhp de Tie2 era: 5'-TGAAGTACCTGATATTCTA-3' (SEQ ID NO:8) (nucleótidos 946-964 en el ADNc de Tie2 humano (TEK), NM_000459). A los 3 días después de la infección, las células se lisaron para transferencia Western para demostrar la anulación de Tie2 (Fig. 3A) o se usaron para probar el efecto de Ang1 nativa sobre la formación de APC en presencia de proteína C y trombina (Fig. 3B). El ensayo de APC se realizó como se describe en el Ejemplo 5 anterior (excepto que la trombina estaba presente a 1 U/ml), en presencia de 1 µM de proteína de control o Ang1. La transferencia de Western para Tie2 se realizó con el clon de anticuerpo monoclonal 33.1 (Peters, *supra*).

20 El gráfico de la Fig. 3B representa las cantidades relativas de APC generada en presencia de 1 µM de proteína de control o Ang1 nativa (a la cantidad de APC generada en presencia de la proteína de control se le asignó un valor de 1,0). Las barras de error representan la DE, n = 3. Ang1 inhibió significativamente la formación de APC en células tratadas con ARNhp de control o ARNhp de Tie2 (***, P < 0,001, ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

25 A pesar de la inhibición casi completa de la expresión de Tie2 por el ARNhp (Fig. 3A), Ang1 todavía era capaz de inhibir la formación de APC (Fig. 3B), lo que indica que Tie2 no se requiere para este efecto.

30 Ejemplo 8. Ang1 y Ang2 inhiben la unión de la trombina a TM

En este ejemplo, se evaluó *in vitro* la capacidad de Ang1 y Ang2 para inhibir la unión de trombina a TM. Se incubó el dominio extracelular de TM soluble (con una etiqueta de 6-His) a 100 nM con trombina 5 nM (Sigma) en presencia de 1 µM de una proteína de control que contiene Fc o 0,25, 0,5 o 1,0 µM de Ang1 nativa (Fig. 4A) o Ang2 nativa (Fig. 4B) en tampón de unión (NaCl 0,15 M, Tris 20 mM pH 7,5, Triton X-100 0,1 %, CaCl₂ 2 mM, 1 mg/ml de BSA) durante 60 minutos en hielo. A continuación, la TM se precipitó mediante incubación durante 60 minutos con 20 µl de perlas de Ni-NTA (Thermo Scientific). A continuación, las perlas se lavaron con tampón de unión y las proteínas unidas se eluyeron calentando en tampón de muestra SDS. A continuación, se realizaron transferencias Western para evaluar la precipitación de TM (anticuerpo monoclonal D-3 de Santa Cruz Biotechnology) y la coprecipitación de trombina (anticuerpo policlonal de cabra de R&D Systems).

40 El aumento de las concentraciones de Ang1 o Ang2 nativas inhibieron progresivamente la asociación de trombina con TM soluble *in vitro*, teniendo Ang2 un efecto más potente (Fig. 4A, 4B). Este resultado sugiere que las angiopoyetinas pueden inhibir la formación de un complejo estable de trombina con TM, y que este es un mecanismo mediante el cual las angiopoyetinas interfieren con la generación de APC y aTAFI.

45 Ejemplo 9. Ang1 está presente en plaquetas de ratón

En este ejemplo, se evaluó la presencia de Ang1 en plaquetas de ratón. Se ha descrito que las plaquetas humanas contienen Ang1 y la liberan tras la estimulación con trombina *in vitro* (Li, J.J. *et al.*, 2001, *Thromb. Haemost.* 85:204-206).

50 Todos los experimentos en ratón fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de Regeneron. Se recogió sangre de ratones C57Bl/6 mediante punción cardíaca y se transfirió a tubos que contenían EDTA y se mezcló inmediatamente. La sangre se centrifugó a continuación a 300 x g durante 10 minutos. El sobrenadante (plasma rico en plaquetas) se recogió y se centrifugó a 2.000 x g durante 10 minutos y a continuación se resuspendió directamente el sedimento en tampón de muestra SDS y se calentó. Se analizaron alícuotas de lisado de plaquetas que representan ~1,6 x 10⁶ de plaquetas en geles SDS junto con las cantidades indicadas (ng) de PF4 de ratón, Ang1 humana o Ang2 humana para permitir la estimación de los niveles de estas proteínas en el lisado de plaquetas. La Ang1 se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce tanto la Ang1 humana como la de ratón (las proteínas Ang1 de ratón y humana son idénticas en un 97 %). Se detectó Ang2 con un anticuerpo policlonal de cabra generado contra un péptido que es idéntico en las proteínas humana y de ratón.

60 A continuación, se utilizaron alícuotas de lisado de plaquetas en transferencias Western, sondando para PF4 (policlonal de cabra de R&D Systems producido contra PF4 de ratón, usado a una dilución de 1:5000), Ang1 (policlonal de conejo generado en QCB para Regeneron, usado a 1 µg/ml) o Ang2 (policlonal de cabra (C-19) de Santa Cruz Biotechnology, usado a una dilución de 1:200). Los anticuerpos Ang1 y Ang2 reconocen tanto las proteínas de ratón como humanas.

Como se muestra en la figura 5A, se detectó la proteína Ang1 en plaquetas de ratón a niveles (~30 ng/10⁶ plaquetas) similar a los descritos en plaquetas humanas (~55 ng/10⁶ plaquetas) (46). Como control positivo, se detectó la presencia de PF4 en lisado de plaquetas a ~3 ng/10⁶ plaquetas, similar al nivel estimado de PF4 en plaquetas humanas (~12 ng/10⁶ plaquetas) (Peterson J.E., *et al.*, 2010, American Journal of Hematology, 85:487-493). En cambio, Ang2 no se detectó en plaquetas de ratón (Fig. 5A). El anticuerpo policlonal usado para detectar Ang2 se generó contra un péptido que es idéntico en Ang2 humana/ratón y este anticuerpo detecta fácilmente Ang2 en lisados de tejido de ratón por transferencia Western. Si bien Ang2 no se observa en las plaquetas, está presente en los cuerpos de Weibel-Palade (WPB) de células endoteliales y se libera tras la estimulación con trombina *in vitro* (Fiedler, U. *et al.*, 2004, Blood, 103:4150-4156), lo que sugiere la posibilidad de que Ang2 se libere de las células endoteliales activadas en los sitios de lesión de los vasos. Ang1 está presente en plaquetas de ratón (Fig. 5A) pero Ang2 no se detecta en plaquetas de ratón (se ha demostrado en la técnica que Ang2 se encuentra en cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales).

Ejemplo 10. Ang1 es 100X superior en suero que en plasma

En este ejemplo, se midió el nivel de Ang1 en suero y plasma de ratón.

Para la preparación del suero, se recogió sangre mediante punción cardíaca y se transfirió a tubos separadores de suero (BD Biosciences). Después de una incubación de 30 minutos para permitir la coagulación de la sangre, las muestras se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos y la capa de suero se recogió y se almacenó a -80 °C.

Para la preparación del plasma, se recogió sangre por punción cardíaca, se transfirió a tubos de EDTA (BD Biosciences), se mezcló y se centrifugó a continuación a 2.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante (plasma deficiente en plaquetas) se recogió y se centrifugó de nuevo a 2.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante de plasma se recogió y se usó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C.

Se recogió sangre de ratones C57BL/6 mediante punción cardíaca y se usó para preparar plasma o suero. A continuación, se determinaron los niveles de Ang1 y PF4 mediante ELISA.

ELISA de Ang1: Se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos (Corning) durante la noche a 4 °C con 10 µg/ml de dominio extracelular de Tie2 marcado con His. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS + Tween 20 al 0,05 % (PBST) y se bloquearon durante 2 horas a TA con PBS + BSA al 3 %. Los pocillos se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 hora con 100 µl de patrón de proteína (Ang1 humana recombinante de R&D Systems) o muestras de plasma/suero diluidas en PBST + BSA al 3 %. Las muestras de plasma se diluyeron 1:5, las muestras de suero se diluyeron 1:20. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron a TA durante 1 hora con 100 µl de anticuerpo anti-Ang1 de cabra biotinilado (R&D Systems, número de catálogo BAF923) 0,2 µg/ml. A continuación, los pocillos se lavaron e incubaron en 100 µl de estreptavidina-HRP (R&D Systems) a una dilución 1:200 durante 20 minutos a TA. A continuación, los pocillos se lavaron e incubaron durante 20 minutos a TA con 100 µl de solución de sustrato (R&D Systems, número de catálogo DY999) protegido de la luz. Se añadieron 50 µl de ácido sulfúrico 1M para detener las reacciones y se leyeron los valores de DO a 450 nm con sustracción a 540 nm.

El ELISA de PF4 se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el CXCL4/PF4 DuoSet de ratón (R&D Systems, número de catálogo DY595). Las muestras de plasma se diluyeron 1:10 o 1:50 y las muestras de suero se diluyeron 1:2000.

Los niveles de Ang1 se dan como concentraciones aparentes ya que la curva estándar utilizada para estimar la concentración de Ang1 se generó con la proteína Ang1 humana. Las barras representan la media y la DE, n = 4. Tanto los niveles de Ang1 como de PF4 fueron significativamente mayores en suero (**, P < 0,01; ***, P < 0,001, prueba de la t). De acuerdo con la liberación de Ang1 de las plaquetas tras la desgranulación *ex vivo*, los niveles de Ang1 fueron ~100 veces mayores en suero que en plasma (Fig. 5B). De manera similar, los niveles de PF4 eran cientos de veces más altos en suero, proporcionando un control positivo (Fig. 5B). Debido a la falta de disponibilidad de un ELISA de Ang2 de ratón confiable, no pudimos comparar los niveles de Ang2 en el suero de ratón con el plasma. Sin embargo, de acuerdo con nuestros datos que muestran la ausencia de Ang2 en las plaquetas, Los niveles de Ang2 en plasma y suero de voluntarios sanos son similares (< 5 ng/ml) (Goede, V., *et al.*, 2010 British Journal of Cancer, 103:1407-1414; Wang.X., *et al.*, 2014, Translational Oncology, 7:188-195).

Ejemplo 11: Ang1 se libera de plaquetas activadas *in vivo*

Para determinar si Ang1 se libera de plaquetas activadas *in vivo*, se midieron los niveles plasmáticos de Ang1 (y PF4 como control positivo) 10 minutos después de la administración intravenosa de trombina a ratones.

Se inyectaron ratones C57BL/6 en la vena de la cola con PBS o 10 unidades de trombina (Sigma) en un volumen de 100 µl. A los 10 minutos después de la inyección, se extrajo sangre mediante punción cardíaca y se preparó plasma para su uso en los ELISA de Ang1 y PF4 como en el Ejemplo 10. Los niveles plasmáticos de Ang1 y PF4 se determinaron mediante ELISA. Las barras representan la media y la DE (n = 9 para PBS, n = 8 para trombina). Los niveles de Ang1 y PF4 fueron significativamente más altos en las muestras tratadas con trombina (**, P < 0,01; ***, P

< 0,001, prueba de la t). Se descartó cualquier sangre que fuera difícil de extraer y las muestras de plasma en las que el nivel de Ang1 era > 30 ng/ml no se utilizaron en el análisis, ya que estas muestras parecían ser valores atípicos y probablemente tenían algún grado de activación plaquetaria y liberación de Ang1 *ex vivo*.

- 5 Como se muestra en la Fig. 5C, los niveles plasmáticos de Ang1 y PF4 fueron significativamente más altos después del tratamiento agudo con trombina, lo que concuerda con la liberación de ambos factores de las plaquetas activadas. El nivel plasmático de Ang1 es mayor después del tratamiento agudo con trombina (lo que concuerda con la liberación de Ang1 de las plaquetas activadas) (Fig. 5C).

10 **Ejemplo 12: Ang1 se libera de las plaquetas en respuesta a una lesión de los vasos sanguíneos**

Para evaluar si Ang1 se libera de las plaquetas en respuesta a una lesión de los vasos sanguíneos, se midieron los niveles de Ang1 en plasma preparado a partir de sangre recogida en el sitio de las incisiones en cola en ratones.

- 15 Se recogió sangre de ratones C57BL/6 mediante punción cardíaca (sistémica) (véase el Ejemplo 9) o mediante una incisión en la cola. En los experimentos de incisión en la cola para evaluar los niveles de Ang1 en la sangre de la herida, se colocaron ratones C57BL/6 bajo una lámpara de calentamiento durante aproximadamente 5 min. A continuación, se colocaron los ratones en un inmovilizador y se cortaron los 2 a 4 mm distales de la cola con un solo corte diagonal. La sangre se recogió en tubos capilares heparinizados durante un período inicial de 30 segundos y se
20 desechó. A continuación se recogió sangre en un segundo tubo capilar heparinado hasta que el tubo estuvo lleno (esto duró 2-5 minutos). Se utilizó una pipeta Pasteur desechable para transferir la sangre a un tubo de microcentrífuga que contenía EDTA. A continuación, se preparó plasma como se describió anteriormente. Para este experimento, las muestras utilizadas para evaluar los niveles plasmáticos sistémicos de Ang1 se recogieron mediante punción cardíaca de animales sin tratamiento previo. Para imitar el procedimiento de preparación de plasma a partir de sangre de la
25 herida, la sangre se almacenó en tubos capilares heparinizados durante 4-5 min antes de ser transferida a un tubo de microcentrífuga que contenía EDTA. Para garantizar que los niveles más altos de Ang1 en las muestras de incisión en la cola no reflejaran simplemente las diferencias en los procedimientos de preparación de plasma, las muestras de sangre de punción cardíaca se incubaron en tubos capilares heparinizados durante 4-5 minutos antes de proceder con el aislamiento del plasma para imitar el procedimiento para las muestras de incisiones en la cola. Se preparó
30 plasma y se determinaron los niveles de Ang1 y PF4 mediante ELISA. Se preparó plasma y se determinaron los niveles de Ang1 y PF4 mediante ELISA como en el Ejemplo 10. Las barras representan la media y la DE (n = 9 para las muestras sistémicas, n = 10 para muestras de incisión en la cola). Los niveles de Ang1 y PF4 fueron significativamente más altos en las muestras de incisión en la cola (***, P < 0,001, prueba de la t).

- 35 Tanto los niveles de Ang1 como de PF4 fueron significativamente más altos en el plasma preparado a partir de sangre de incisión en la cola que en el plasma preparado a partir de sangre sistémica (recolectada mediante punción cardíaca) (Fig. 5D), lo que sugiere la liberación de Ang1 de las plaquetas en el sitio de la lesión. El nivel de Ang1 fue mayor en el plasma preparado a partir de sangre de incisión en la cola que en el plasma preparado a partir de sangre sistémica, lo que sugiere la liberación de Ang1 de las plaquetas en el sitio de la lesión (Fig. 5D).

40 **Ejemplo 13. La administración intravenosa de BowAng1 y BowAng2 a ratones promueve un rápido aumento del nivel de trombina/antitrombina circulante y de la deposición de fibrina en el pulmón**

- 45 En este ejemplo, se evaluó el efecto de BowAng1 y BowAng2 sobre el nivel de trombina/antitrombina circulante y sobre la deposición de fibrina en el pulmón.

- A los 20 minutos después de la inyección intravenosa de 6 mg/kg de control Fc, BowAng1 o BowAng2, se extrajeron los pulmones. Los pulmones se homogeneizaron en PBS helado que contenía cóctel inhibidor de proteasa cOplete™ (con EDTA) más 10 unidades/ml de heparina. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los lisados se
50 centrifugaron durante 10 minutos en una microcentrífuga. Los sedimentos se resuspendieron en urea 3M y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para extraer la fibrina reticulada. A continuación, las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos en una microcentrífuga. Los sedimentos se resuspendieron en tampón de muestra SDS-PAGE y se incubaron a 65 °C durante 90 minutos. La cantidad de fibrina en las muestras se determinó mediante transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal anti-fibrina de American Diagnostica (Fig. 6A).

- 55 A los 20 minutos después de la inyección intravenosa de control Fc, BowAng1 (7,5 mg/kg) o BowAng2 (4 mg/kg), los niveles del complejo trombina/antitrombina III en plasma se midieron usando un kit de inmunoensayo enzimático de sándwich (Enzygnost® TAT micro, Dade Behring) (Fig. 6B).

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Daly, Christopher Davis, Samuel

- 65 <120> Uso de angiopoyetinas en la promoción de la coagulación sanguínea y en el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea

ES 2 867 249 T3

<130> 10194WO01

<160> 9

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1977

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 1

```

ttcagagact ggcgccgacgt gtaccaggcc ggcttcaaca agtccggcat ctacaccatc      60
tacatcaaca acatgcctga gcctaagaag gtgttctgca acatggacgt gaacggcggc      120
ggctggacag tgatccagca cagagaggac ggctccctgg acttccagag aggctggaag      180
gagtacaaga tgggcttcgg caacccttcc ggcgagtact ggctgggcaa cgagttcatc      240
ttcgccatca cctcccagag acagtacatg ctgagaatcg agctgatgga ctgggagggc      300
aacagagcct actcccagta cgacagattc cacatcggca acgagaagca gaactacaga      360
ctgtacctga agggccacac cggcaccgcc ggcaagcagt cctccctgat cctccacggc      420
gccgacttct ccaccaagga cgccgacaac gacaactgca tgtgcaagtg cgccctgatg      480
ctgaccggcg gctggtggtt cgacgcctgc ggcccttcca acctgaacgg catgttctac      540
accgcccggc agaaccacgg caagctgaac ggcacaaagt ggcactactt caaaggccct      600
tctactccc tgaggtcgac caccatgatg atcagacctc tggacttoga caaaactcac      660
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc      720
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg      780
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg      840
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      900
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      960
aaciaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga     1020
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc     1080
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat     1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc     1200

```

ES 2 867 249 T3

ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320
 ccgggtttta gagactgcmc agatgtatat caagctgggtt ttaataaaaag tggaatctac 1380
 actatttata ttaataatat gccagaaccc aaaaaggtgt tttgcaatat ggatgtcaat 1440
 gggggaggtt ggactgtaat acaacatcgt gaagatggaa gtctagattt ccaaagaggc 1500
 tggaaggaat ataaaatggg ttttggaat ccctccgggtg aatattggct ggggaatgag 1560
 tttatTTTTg ccattaccag tcagaggcag tacatgctaa gaattgagtt aatggactgg 1620
 gaagggaaacc gagcctattc acagtatgac agattccaca taggaaatga aaagcaaaac 1680
 tataggttgt atttaaaagg tcacactggg acagcaggaa aacagagcag cctgatctta 1740
 cacggtgctg atttcagcac taaagatgct gataatgaca actgtatgtg caaatgtgcc 1800
 ctcatgtaa caggaggatg gtggtttgat gcttgtggcc cctccaatct aatggaatg 1860
 ttctatactg cgggacaaaa ccatggaaaa ctgaatggga taaagtggca ctacttcaaa 1920
 gggccaagtt actccttacg ttccacaact atgatgattc gacctttaga tttttaa 1977

<210> 2
 <211> 658
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 2

Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly
 1 5 10 15
 Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe
 20 25 30
 Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg
 35 40 45
 Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met
 50 55 60
 Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile
 65 70 75 80
 Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met
 85 90 95
 Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile

ES 2 867 249 T3

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

ES 2 867 249 T3

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 435 440 445

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 450 455 460

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 485 490 495

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 500 505 510

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 515 520 525

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 530 535 540

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 545 550 555 560

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 565 570 575

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 580 585 590

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 595 600 605

ES 2 867 249 T3

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
610 615 620

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
625 630 635 640

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
645 650 655

Asp Phe

<210> 3
<211> 2025
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 3

agagactgtg ctgaagtatt caaatcagga cacaccacaa atggcatcta cacgttaaca 60
ttccctaatt ctacagaaga gatcaaggcc tactgtgaca tggaagctgg aggaggcggg 120
tggacaatta ttcagcgcag tgaggatggc agcgttgatt ttcagaggac ttggaagaa 180
tataaagtgg gatttggtaa cccttcagga gaatattggc tgggaaatga gtttgtttcg 240
caactgacta atcagcaacg ctatgtgctt aaaatacacc ttaaagactg ggaaggaat 300
gaggcttact cattgtatga acatttctat ctctcaagtg aagaactcaa ttataggatt 360
caccttaaag gacttacagg gacagccggc aaaataagca gcatcagcca accaggaaat 420
gattttagca caaaggatgg agacaacgac aaatgtattt gcaaatgttc acaaatgcta 480
acaggaggct ggtggtttga tgcattgtgt ccttccaact tgaacggaat gtactatcca 540
cagaggcaga acacaaataa gttcaacggc attaaatggg actactggaa aggctcaggc 600
tattcgctca aggccacaac catgatgatc cgaccagcag atttcggggg cccgggcgag 660
cccaaactct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

ES 2 867 249 T3

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggcgggtg gcggttctgg cgcgcctaga 1380
 gactgtgctg aagtattcaa atcaggacac accacaaatg gcatctacac gttaacattc 1440
 cctaattcta cagaagagat caaggcctac tgtgacatgg aagctggagg aggcgggtgg 1500
 acaattattc agcgacgtga ggatggcagc gttgattttc agaggacttg gaaagaatat 1560
 aaagtgggat ttggaaccc ttcaggagaa tattggctgg gaaatgagtt tgtttcgcaa 1620
 ctgactaatc agcaacgcta tgtgcttaaa atacacctta aagactggga agggaatgag 1680
 gcttactcat tgtatgaaca tttctatctc tcaagtgaag aactcaatta taggattcac 1740
 cttaaaggac ttacagggac agccggcaaa ataagcagca tcagccaacc aggaaatgat 1800
 tttagcaciaa aggatggaga caacgacaaa tgtatattgca aatgttcaca aatgctaaca 1860
 ggaggctggt ggtttgatgc atgtggtcct tccaacttga acggaatgta ctatccacag 1920
 aggcagaaca caaataagtt caacggcatt aaatggtact actggaaagg ctcaggctat 1980
 tcgctcaagg ccacaacat gatgatccga ccagcagatt tctga 2025

<210> 4
 <211> 674
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 4

Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile
 1 5 10 15
 Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys
 20 25 30
 Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu
 35 40 45
 Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly
 50 55 60
 Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser
 65 70 75 80
 Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp

ES 2 867 249 T3

				85					90					95			
Trp	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Leu	Ser		
			100					105					110				
Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Ile	His	Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr		
		115					120					125					
Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Gln	Pro	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr		
	130					135					140						
Lys	Asp	Gly	Asp	Asn	Asp	Lys	Cys	Ile	Cys	Lys	Cys	Ser	Gln	Met	Leu		
145					150					155					160		
Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly		
				165					170					175			
Met	Tyr	Tyr	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Thr	Asn	Lys	Phe	Asn	Gly	Ile	Lys		
			180					185					190				
Trp	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Thr	Thr	Met		
		195					200					205					
Met	Ile	Arg	Pro	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
	210					215					220						
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly		
225					230					235					240		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
				245					250					255			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
			260					265					270				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
		275					280					285					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
	290					295					300						
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
305					310					315					320		
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
				325					330					335			

ES 2 867 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Arg Asp Cys Ala Glu
 450 455 460

Val Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe
 465 470 475 480

Pro Asn Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly
 485 490 495

Gly Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp
 500 505 510

Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 515 520 525

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln
 530 535 540

Gln Arg Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu
 545 550 555 560

Ala Tyr Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn
 565 570 575

Tyr Arg Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser
 580 585 590

ES 2 867 249 T3

Ser Ile Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn
 595 600 605

Asp Lys Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 610 615 620

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln
 625 630 635 640

Arg Gln Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys
 645 650 655

Gly Ser Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala
 660 665 670

Asp Phe

<210> 5
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 5

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Arg
 1 5 10 15

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

Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn
 35 40 45

Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp
 50 55 60

Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe
 65 70 75 80

Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala
 85 90 95

Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp
 100 105 110

5

10

ES 2 867 249 T3

Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn
 115 120 125

Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala
 130 135 140

Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys
 145 150 155 160

Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr
 165 170 175

Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met
 180 185 190

Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp
 195 200 205

His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met
 210 215 220

Ile Arg Pro Leu Asp Phe Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

ES 2 867 249 T3

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

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

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

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

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

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

Lys
 465

<210> 6
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 6

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Arg
 1 5 10 15

Asp Cys Ala Glu Val Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr
 20 25 30

Thr Leu Thr Phe Pro Asn Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp
 35 40 45

Met Glu Ala Gly Gly Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp
 50 55 60

Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe
 65 70 75 80

Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln
 85 90 95

5

10

ES 2 867 249 T3

Leu Thr Asn Gln Gln Arg Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp
 100 105 110

Glu Gly Asn Glu Ala Tyr Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser
 115 120 125

Glu Glu Leu Asn Tyr Arg Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala
 130 135 140

Gly Lys Ile Ser Ser Ile Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys
 145 150 155 160

Asp Gly Asp Asn Asp Lys Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr
 165 170 175

Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met
 180 185 190

Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp
 195 200 205

Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met
 210 215 220

Ile Arg Pro Ala Asp Phe Gly Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

ES 2 867 249 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

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

Gly Lys
 465

<210> 7
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 7

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Arg
 1 5 10 15

Asp Cys Ala Glu Val Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr
 20 25 30

Thr Leu Thr Phe Pro Asn Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp
 35 40 45

Met Glu Ala Gly Gly Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp
 50 55 60

Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe
 65 70 75 80

ES 2 867 249 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

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

Gly Lys
 465

5 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 8
 tgaagtacct gatattcta 19

15 <210> 9
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 9

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

ES 2 867 249 T3

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

ES 2 867 249 T3

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

ES 2 867 249 T3

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
 740 745

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína angiopoyetina AngF1-Fc-F1 para usar en un método de estimulación de la coagulación sanguínea, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína angiopoyetina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde el sujeto se somete a cirugía.
- 10 3. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde el sujeto sufre una hemorragia debido a una lesión.
4. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde la proteína angiopoyetina se une a un dominio extracelular soluble purificado de trombomodulina con un valor de CE_{50} de menos de 100 nM.
- 15 5. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde la proteína angiopoyetina se administra por vía intravenosa.
- 20 6. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde la proteína angiopoyetina se administra por vía subcutánea.
7. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde la proteína angiopoyetina se administra en un sitio de lesión o en un sitio asociado con un procedimiento quirúrgico.
- 25 8. La proteína angiopoyetina para usar en el método de la reivindicación 1, en donde la angiopoyetina modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

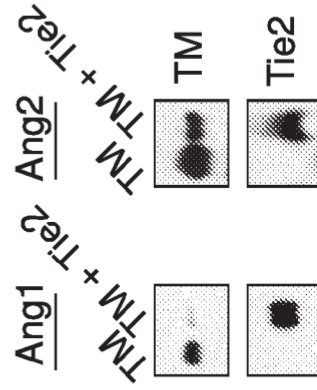
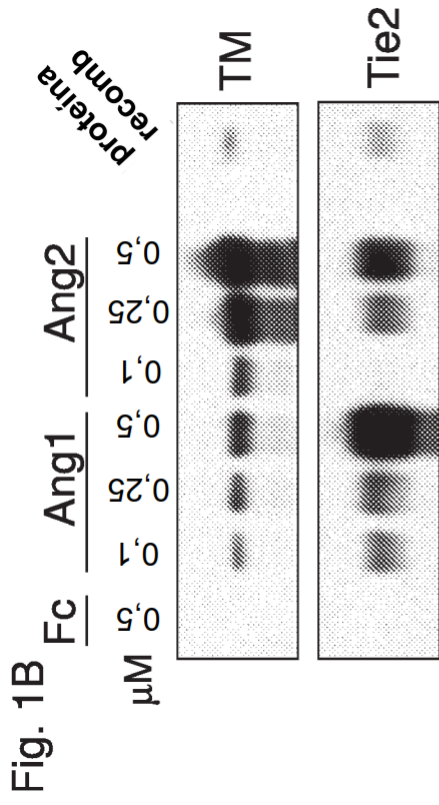
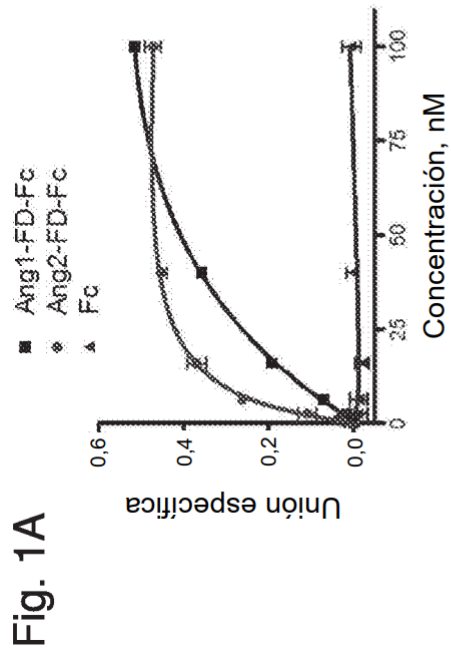


Fig. 2A

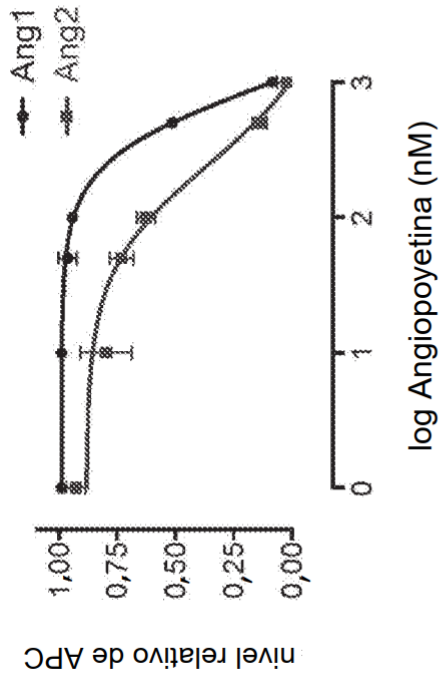


Fig. 2B

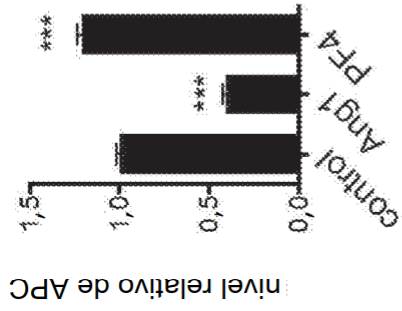


Fig. 2C

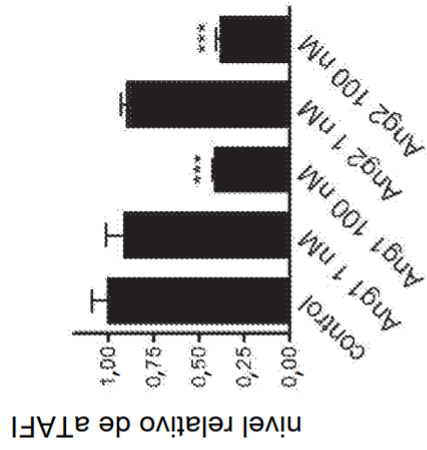


Fig. 2D

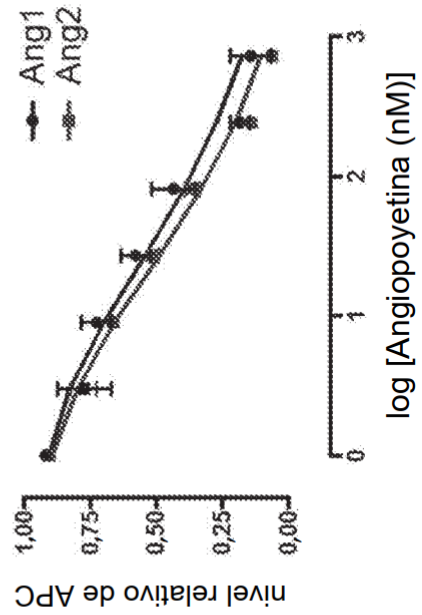


Fig. 2E

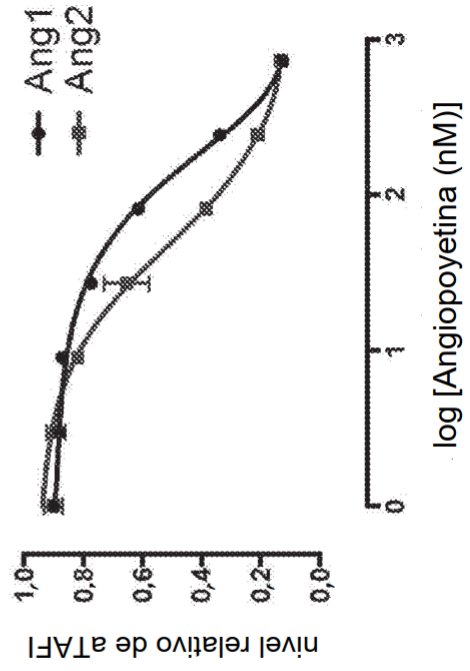


Fig. 3A

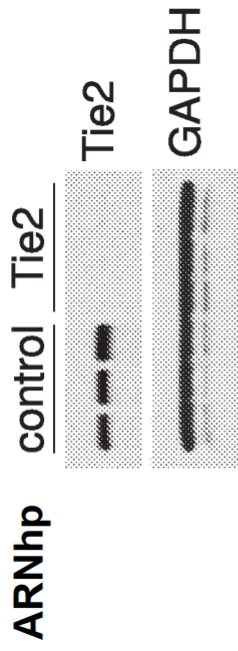


Fig. 3B

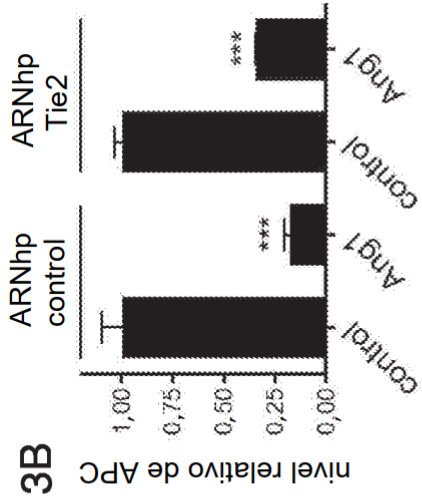


Fig. 4A

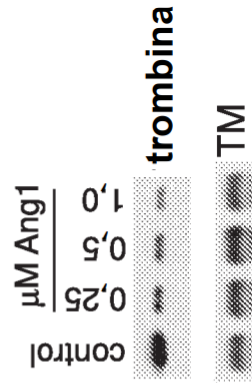
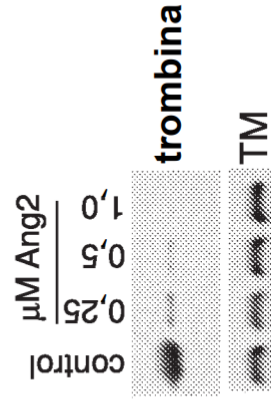


Fig. 4B



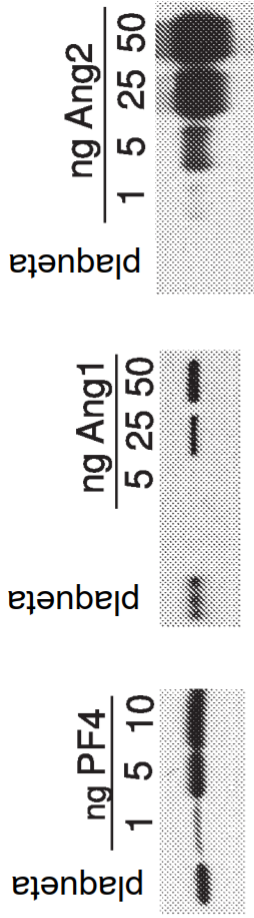


Fig. 5A

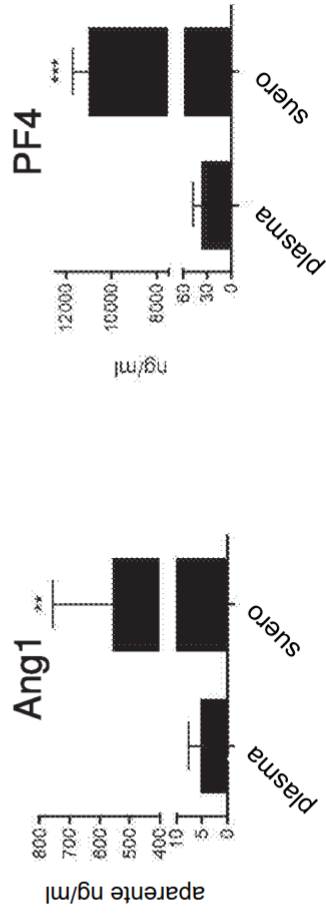


Fig. 5B

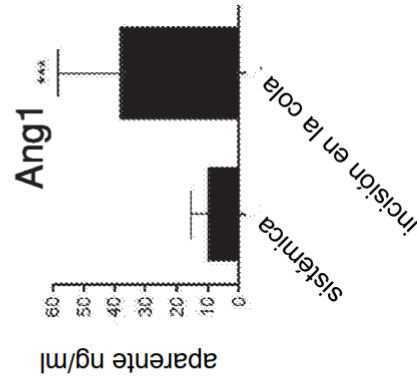
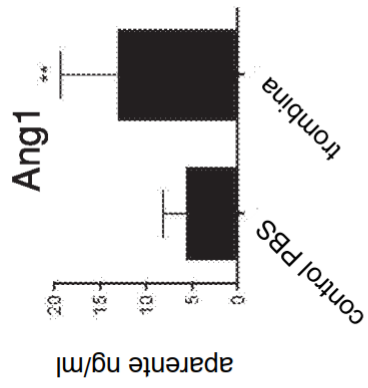
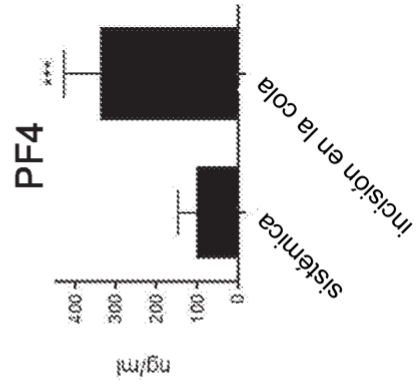
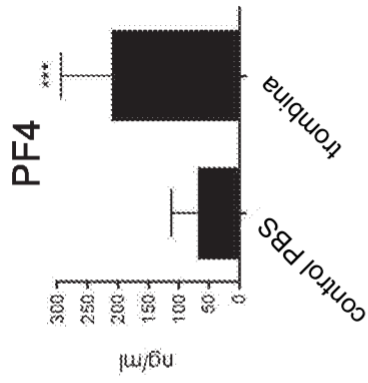


Fig. 5C

Fig. 5D

Fig. 6A



Fig. 6B

