



No. 12-031220-00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:19:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 463



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A
DLL4”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/28**

71. SOLICITANTE **ABBOTT LABORATORIES**

DOMICILIO **ABBOTT PARK, ESTADO DE ILLINOIS,
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **22 FEB 2012**

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-031220- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:19:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 463

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ABBOTT LABORATORIES Dirección: 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: Abbott Park, Estado de Illinois, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de Illinois, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		IDENTIFICACION C.C.☐ C.E.☐ NIT☐ Otro☐ Cual Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		C.C.☒ C.E.☐ NIT☐ Otro☐ Cual Número 39.690.713 TP 53.215
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: BENATUIL, Lorenzo; BOGHAERT, Erwin, R.; GU, Jijie; HARRIS Maria; HICKSON, Jonathan, A; HSIEH, Chung-Ming; KUTSKOVA, Yuliya; LI, Yingchun; LIU, Zhihong y MORGAN-LAPPE, Susan. Dirección: 33 Mohawk Drive, Northborough, MA 01532; 4510 Springbrook Road, Pleasant Prairie, WI 53158; 19 Crimson Drive, Shrewsbury, MA 01545; 55 Trowbridge Lane, Shrewsbury, MA 01545; 725 Northwind Lane, Lake Villa, IL 60046; 22 Olde Field Road, Newton, MA 02459; 183 Whitney Street, Northborough, MA 01532; 103 Newfield Drive, Buffalo, Grove, IL 60089; 1455 Greystone Avenue, Gurnee, IL 60031 y 5419 North Canfield Avenue, Chicago, IL 60656. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2010/047006 Fecha: 27/08/10 Publicación Internacional No. WO 2011/025964 A3 Fecha: 03/03/11			
6 Título (54) "PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4"			
7 Clasificación Internacional (51) C07K 16/28			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI☒ NO☐	US US	29-08-09 16-11-09	61/238,152 61/261,728
9 Comprobante de Pago No. 12-004148			Fecha: 16 de Enero de 2012

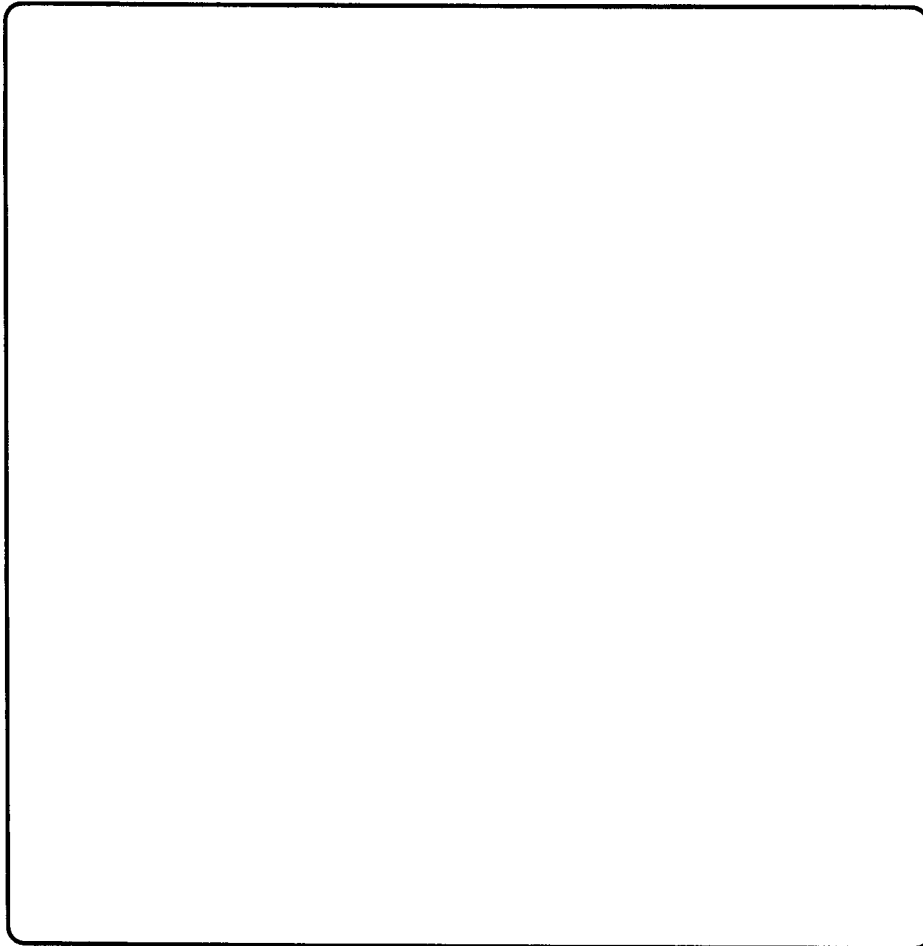
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Opinión Escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215 ✓

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

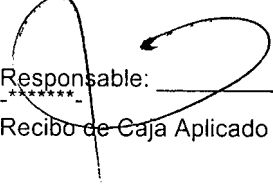
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 004148
		Bogotá D.C., Enero 16 de 2012 - 16:37:37

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415004715	16/01/2012	47.015.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			<u>\$590.000.00</u>
			=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-031220- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:19:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 463

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 16 de 2012 - 16:37:48

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

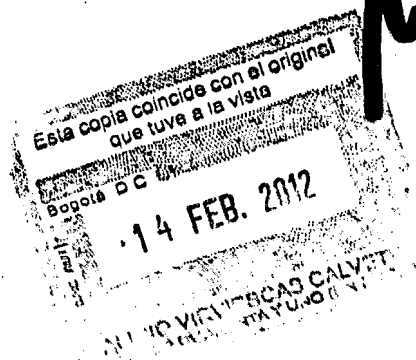
T.P. No. 53.215

9

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-05-16-324
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o



demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de julio de 2004

(firma: ilegible)

Laura J. Schumacher

Vicepresidente, Secretaria y Asesor Legal General Asistente



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América)

Estado de) ss:

Condado de)

En este día 12 de julio de 2004, compareció Laura J. Schumacher, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que ella es la Vicepresidenta, Secretaria y Asesora de ABBOTT LABORATORIES, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Chicago, Estado de Illinois, con fecha 12 de septiembre de 2003, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

(firma: ilegible)

Notario Público



Estado de Illinois
Secretario de Estado
Springfield, Illinois

Apostilla

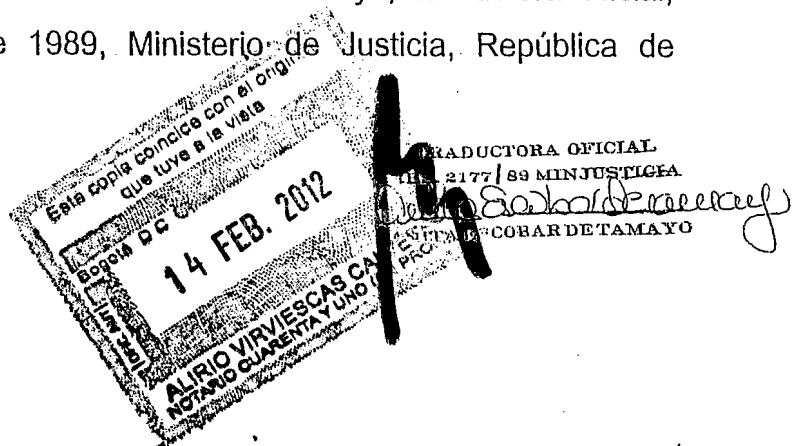
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

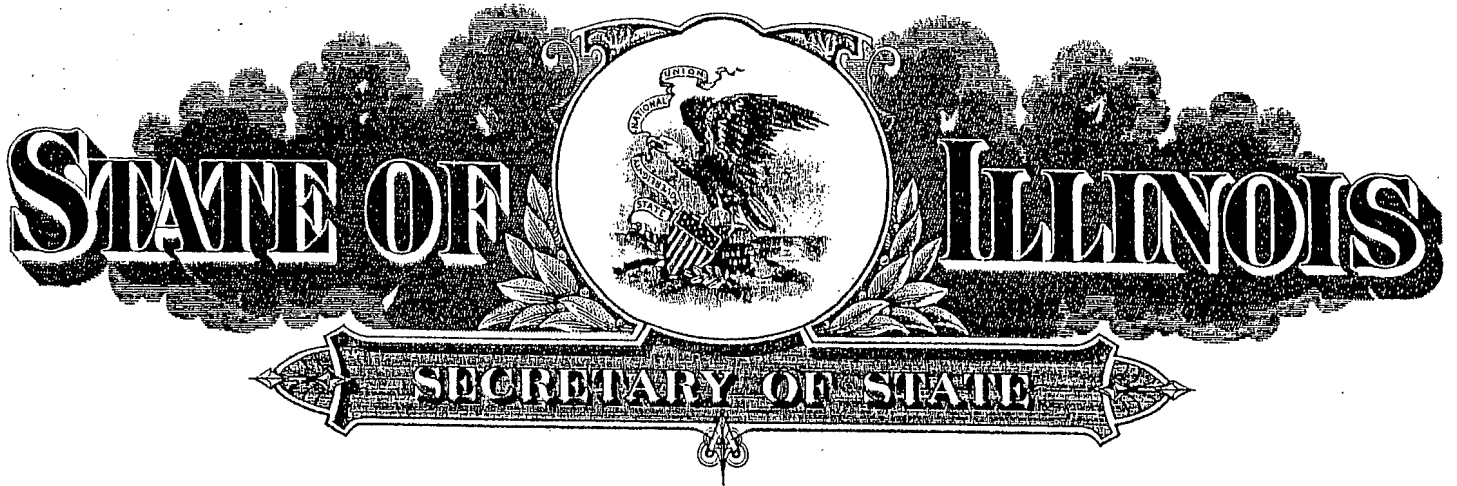
1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
3. ha sido firmado por Trina Lee Ruiz
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

5. en Springfield, Illinois
6. el día 20 de julio de 2004
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S04VB11001
9. Sello/Estampilla
10. Firma (ilegible)
- Sello del Estado de Illinois
- Jesse White
- Secretario de Estado
- Estado de Illinois

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 16 de mayo de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 del 15 de agosto de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.





SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
- This public document
2. has been signed by TRINA LEE RUIZ
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

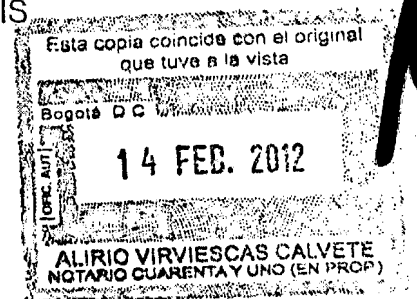
Certified

5. Springfield, Illinois
6. JULY 20, 2004
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. S04VB11001
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América,

con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de Julio de 2004



The undersigned, **ABBOTT LABORATORIES**, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America,

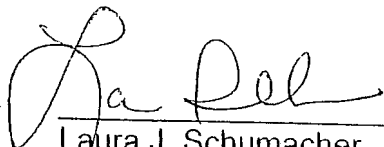
domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

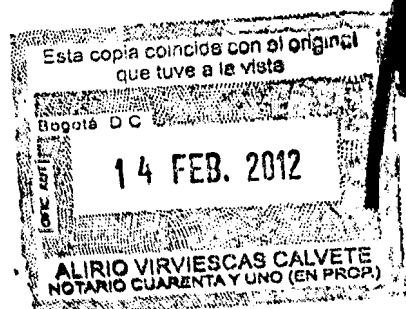
Doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications and registrations, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and additionally we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to conciliate, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 12th day of July, 2004



Laura J. Schumacher
Vice President, Secretary and Deputy General
Counsel



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
 Estado de {ss
 Condado de
 Hoy 12 de Julio de 2004, compareció
 Laura J. Schumacher, a quien conozco y
 de quien me consta que firmó el anterior documento,
 y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
 éles Vice Presidenta, Secretaria y Asesora
 de ABBOTT

LABORATORIES, la compañía nombrada en el
 documento que antecede, una sociedad
 debidamente organizada y existente conforme a las
 leyes del Estado de Illinois, Estados
 Unidos de América, domiciliada en la ciudad de
 Abbott Park, Condado de Lake
 Estado de Illinois, Estados Unidos de
 América, legalmente constituida para un período de
 duración que aún no ha terminado, que ejerce su
 objeto social conforme a las leyes del Estado de
 Illinois, Estados Unidos de América;
 que el declarante está autorizado por dicha
 Compañía para conferir este poder; que el sello
 estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
 representación de la expresada Compañía, es el
 sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
 confiere este instrumento está comprendido dentro
 del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
 incorporación firmados en Chicago
 Estado de Illinois, con fecha Sep. 12, 2003,
 y certifica que de conformidad con la legislación de
 dicho Estado la anterior declaración juramentada es
 prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
 versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

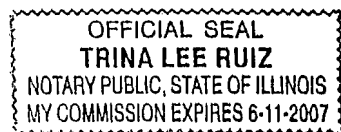
NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
 State of {ss
 County of
 On this 12th day of July, 2004,
 personally
 came
 to me known, and known to me to be the person who
 signed the foregoing instrument, who being by me
 duly sworn did depose and say that she is the Vice President
 Secretary and Deputy
 General Counsel of ABBOTT

LABORATORIES, the company named within, a
 Corporation organized and existing under the laws of
 the State of Illinois, United
 States of America, domiciled at the City of Abbott Park
 County of Lake
 State of Illinois, United States of America,
 legally constituted for a period of tenure not yet
 expired, which exercises its corporate purposes
 according to the laws of the State of Illinois,
 United States of America; that the deponent is
 authorized by said Company to confer this power of
 attorney; that the seal affixed hereunto by the
 deponent in the name and on behalf of said
 Corporation is the corporate seal thereof; and that the
 purpose for which this instrument is granted is
 included within the corporate purposes of the
 Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
 of Incorporation of said Corporation executed at
 Chicago, State of Illinois, under date of
 September 12, 2003, and hereby
 certifies that under the laws of said State the
 foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
 facts therein contained are true, which he attests.

Trina Lee Ruiz



 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 22-02-12 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/238,152 29-08-09 US 61,261,728 16-11-09 US (51) Int Cl: CO7K 16/28 (71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES (72) Inventor(es): BENATUIL, Lorenzo; BOGHAERT, Erwin, R.; GU, Jijie; HARRIS Maria; HICKSON, Jonathan, A; HSIEH, Chung-Ming; KUTSKOVA, Yuliya; LI, Yingchun; LIU, Zhihong y MORGAN-LAPPE, Susan. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 29-03-12 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-10 No. de solicitud: PCT/US2010/047006 (87) Publicación internacional Fecha: 03-03-11 N° publicación: WO 2011/025964 A3	
(54) Titulo: "PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4"	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen: Se describen proteínas de unión a DLL4 mejoradas, incluyendo anticuerpos, anticuerpos de CDR injertada, anticuerpos humanos, y fragmentos de unión a DLL4 de los mismos, proteínas que se unen a DLL4 con alta afinidad, y proteínas de unión a DLL4 que neutralizan la actividad de DLL4. Las proteínas de unión a DLL4 son útiles para el tratamiento o prevención de cánceres y tumores y especialmente para el tratamiento o prevención de la angiogénesis de tumor y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis tales como neovascularización ocular, o enfermedades independientes de la angiogénesis caracterizadas por la expresión o actividad aberrante de DLL4 tales como trastornos autoinmunes que incluyen esclerosis.

Sector: Industria farmaceutica, específicamente proteínas de unión a DLL4 y composiciones farmacéuticas que las contienen, capaces de inhibir, prevenir o tratar canceres, tumores y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO		
PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____				
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 22-02-12		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm		
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28				
(71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES				
(72) Inventor(es): BENATUIL, Lorenzo; BOGHAERT, Erwin, R.; GU, Jijie; HARRIS Maria; HICKSON, Jonathan, A; HSIEH, Chung-Ming; KUTSKOVA, Yuliya; LI, Yingchun; LIU, Zhihong y MORGAN-LAPPE, Susan.				
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE				
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	
	61/238,152	29-08-09	US	
	61,261,728	16-11-09	US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-03-12		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 03-03-11		
Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-10		No. Publicación : WO 2011/025964 A3		
No. de solicitud: PCT/US2010/047006				
(54) Título: "PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4"				
(57) Resumen - Reivindicación(es):				
Resumen: Se describen proteínas de unión a DLL4 mejoradas, incluyendo anticuerpos, anticuerpos de CDR injertada, anticuerpos humanos, y fragmentos de unión a DLL4 de los mismos, proteínas que se unen a DLL4 con alta afinidad, y proteínas de unión a DLL4 que neutralizan la actividad de DLL4. Las proteínas de unión a DLL4 son útiles para el tratamiento o prevención de cánceres y tumores y especialmente para el tratamiento o prevención de la angiogénesis de tumor y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis tales como neovascularización ocular, o enfermedades independientes de la angiogénesis caracterizadas por la expresión o actividad aberrante de DLL4 tales como trastornos autoinmunes que incluyen esclerosis. Sector: Industria farmacéutica, específicamente proteínas de unión a DLL4 y composiciones farmacéuticas que las contienen, capaces de inhibir, prevenir o tratar cánceres, tumores y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis				



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:	(22) Fecha de solicitud: 22-02-12		
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28			
(71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES			
(72) Inventor(es): BENATUIL, Lorenzo; BOGHAERT, Erwin, R.; GU, Jijie; HARRIS Maria; HICKSON, Jonathan, A; HSIEH, Chung-Ming; KUTSKOVA, Yuliya; LI, Yingchun; LIU, Zhihong y MORGAN-LAPPE, Susan..			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/238,152	29-08-09	US
	61,261,728	16-11-09	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-03-12		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 03-03-11	
Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-10		N° publicación: WO 2011/025964 A3	
No. de solicitud: PCT/US2010/047006			
(54) TÍTULO: "PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4"			



PCT



(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/047006

(22) International Filing Date:
27 August 2010 (27.08.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/238,152 29 August 2009 (29.08.2009) US
61/261,728 16 November 2009 (16.11.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BENATUIL, Lorenzo** [VE/US]; 33 Mohawk Drive, Northborough, MA 01532 (US). **BOGHAERT, Erwin, R.** [BE/US]; 4510 Springbrook Road, Pleasant Prairie, WI 53158 (US). **GU, Jijie** [US/US]; 19 Crimson Drive, Shrewsbury, MA 01545 (US). **HARRIS, Maria** [IT/US]; 55 Trowbridge Lane, Shrewsbury, MA 01545 (US). **HICKSON, Jonathan, A.** [US/US]; 725 Northwind Lane, Lake Villa, IL 60046 (US). **HSIEH, Chung-Ming** [US/US]; 22 Olde Field Road, Newton, MA 02459 (US). **KUTSKOVA, Yuliya** [RU/US]; 183 Whitney Street, Northborough, MA 01532 (US). **LI, Yingchun** [CN/US]; 103 Newfield Drive, Buffalo Grove, IL 60089 (US). **LIU, Zhihong** [CN/US]; 1455 Greystone Avenue, Gurnee, IL 60031 (US). **MORGAN-LAPPE, Susan** [US/US]; 5419 North Canfield Avenue, Chicago, IL 60656 (US).

(74) Agents: **REININGER, Irene, M.** et al.; Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
21 April 2011

(54) Title: THERAPEUTIC DLL4 BINDING PROTEINS

(57) Abstract: Improved DLL4 binding proteins are described, including antibodies, CDR-grafted antibodies, human antibodies, and DLL4 binding fragments thereof, proteins that bind DLL4 with high affinity, and DLL4 binding proteins that neutralize DLL4 activity. The DLL4 binding proteins are useful for treating or preventing cancers and tumors and especially for treating or preventing tumor angiogenesis, and/or other angiogenesis-dependent diseases such as ocular neovascularization, or angiogenesis-independent diseases characterized by aberrant DLL4 expression or activity such as autoimmune disorders including multiple sclerosis.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 10289W001	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2010/047006	International filing date (day/month/year) 27/08/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29/08/2009
Applicant ABBOTT LABORATORIES		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/047006

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/047006

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-72, 77-93

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/047006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of D114 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE05313, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 1083-1087, XP002489428 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-72, 77-93
X	WO 2008/076379 A2 (REGENERON PHARMA [US]; PAPADOPOULOS NICHOLAS J [US]; MARTIN JOEL H [US] 26 June 2008 (2008-06-26) The whole document, in particular SEQ ID NO:180 ----- -/--	1-72, 77-93



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 2010

Date of mailing of the international search report

10/03/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chapman, Rob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/047006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAINSON ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB LNKD- DOI:10.1016/J.MOLMED.2007.07.002, vol. 13, no. 9, 14 September 2007 (2007-09-14), pages 389-395, XP022245395 ISSN: 1471-4914 the whole document -----	1-72, 77-93
X	NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE05355, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 1032-1037, XP002489427 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-72, 77-93
X	WO 2008/060705 A2 (GENENTECH INC [US]; YAN MINHONG [US]; WU YAN [US]) 22 May 2008 (2008-05-22) the whole document -----	1-72, 77-93
X	WO 2007/143689 A2 (GENENTECH INC [US]; YAN MINHONG [US]) 13 December 2007 (2007-12-13) the whole document -----	1-72, 77-93
X	HOEY T ET AL: "DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency" CELL STEM CELL, CELL PRESS, US LNKD- DOI:10.1016/J.STEM.2009.05.019, vol. 5, no. 2, 7 August 2009 (2009-08-07), pages 168-177, XP002564818 ISSN: 1934-5909 [retrieved on 2009-08-06] the whole document -----	1-72, 77-93
X	US 2009/035308 A1 (GILL PARKASH [US] ET AL) 5 February 2009 (2009-02-05) the whole document -----	1-72, 77-93
X	GB 2 449 354 A (SMART TARGETING LTD [GB]) 19 November 2008 (2008-11-19) the whole document -----	1-72, 77-93
X	WO 2008/042236 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS INC [US]; GURNEY AUSTIN [US]; HOEY TIMOTHY [US]) 10 April 2008 (2008-04-10) the whole document -----	1-72, 77-93
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/047006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/070671 A2 (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21) the whole document -----	1-72, 77-93
X,P	WO 2009/124931 A2 (ABLYNX NV [BE]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOTT [BE]; DE HAARD JOHANNES JO) 15 October 2009 (2009-10-15) The whole document, in particular Example 4 -----	1-72, 77-93
X,P	WO 2009/134776 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; MORGAN-LAPPE SUSAN E [US]; REILLY) 5 November 2009 (2009-11-05) the whole document -----	1-72, 77-93
X,P	WO 2010/032060 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; MEDIMMUNE LTD [GB]; BEDIAN VAHE [US]; FOLTZ IAN [C] 25 March 2010 (2010-03-25) the whole document -----	1-72, 77-93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/047006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008076379	A2	26-06-2008	
		AU 2007334366 A1	26-06-2008
		CA 2672622 A1	26-06-2008
		CR 10863 A	23-07-2009
		EC SP099404 A	31-07-2009
		EP 2115003 A2	11-11-2009
		JP 2010512749 T	30-04-2010
		KR 20090088936 A	20-08-2009
		SV 2009003296 A	27-10-2009
		US 2008181899 A1	31-07-2008
		US 2009017035 A1	15-01-2009
		US 7534868 B1	19-05-2009
WO 2008060705	A2	22-05-2008	
		AR 061246 A1	13-08-2008
		AU 2007319672 A1	22-05-2008
		CA 2654000 A1	22-05-2008
		EC SP099027 A	27-02-2009
		EP 2032604 A2	11-03-2009
		JP 2009539384 T	19-11-2009
		KR 20090027227 A	16-03-2009
		US 2008175847 A1	24-07-2008
		US 2010292312 A1	18-11-2010
WO 2007143689	A2	13-12-2007	
		AR 061245 A1	13-08-2008
		AU 2007256617 A1	13-12-2007
		CA 2654304 A1	13-12-2007
		CR 10529 A	02-03-2009
		EC SP099032 A	27-02-2009
		EP 2029159 A2	04-03-2009
		JP 2009539870 T	19-11-2009
		KR 20090016762 A	17-02-2009
		RU 2008152435 A	20-07-2010
		US 2010129356 A1	27-05-2010
		US 2008014196 A1	17-01-2008
US 2009035308	A1	05-02-2009	
		CA 2710082 A1	09-07-2009
		CN 101970004 A	09-02-2011
		WO 2009085209 A2	09-07-2009
GB 2449354	A	19-11-2008	
		EP 2167542 A1	31-03-2010
		WO 2008139202 A1	20-11-2008
		JP 2010526551 T	05-08-2010
		US 2010303812 A1	02-12-2010
WO 2008042236	A2	10-04-2008	
		AU 2007305443 A1	10-04-2008
		CA 2664738 A1	10-04-2008
		CO 6180466 A2	19-07-2010
		CR 10667 A	25-05-2009
		EA 200970335 A1	30-10-2009
		EP 2066694 A2	10-06-2009
		JP 2010504755 T	18-02-2010
		KR 20090078334 A	17-07-2009
		US 2010316637 A1	16-12-2010
		US 2008187532 A1	07-08-2008
WO 2007070671	A2	21-06-2007	
		AU 2006326417 A1	21-06-2007
		CA 2630839 A1	21-06-2007
		EP 1962895 A2	03-09-2008
		JP 2009519944 T	21-05-2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/047006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007070671 A2		NZ 568739 A US 2008107648 A1	30-09-2010 08-05-2008
WO 2009124931 A2	15-10-2009	AU 2009235467 A1 CA 2720763 A1 EP 2260058 A2	15-10-2009 15-10-2009 15-12-2010
WO 2009134776 A2	05-11-2009	AR 071526 A1 AU 2009241589 A1 CA 2722466 A1 EP 2282769 A2 PE 18452009 A1 US 2010076178 A1 UY 31792 A	23-06-2010 05-11-2009 05-11-2009 16-02-2011 08-01-2010 25-03-2010 14-12-2009
WO 2010032060 A1	25-03-2010	US 2010196385 A1	05-08-2010

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-72, 77-93

Binding proteins comprising regions from antibody E9 and modified versions thereof and related subject matter

2. claims: 94-165, 170-187

Binding proteins comprising regions from antibody A10 and modified versions thereof and related subject matter

3. claims: 73-76, 166-169

Compositions for the release of binding proteins and related subject matter

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2010/047006

International filing date (day/month/year)
27.08.2010

Priority date (day/month/year)
29.08.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28

Applicant
ABBOTT LABORATORIES

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Chapman, Rob

Telephone No. +49 89 2399-2855



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2010/047006

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 73-76, 94-187

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 73-76, 94-187

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-72, 77-93

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement
- | | | |
|-------------------------------|-------------|--------------------|
| Novelty (N) | Yes: Claims | <u>2-72, 77-93</u> |
| | No: Claims | <u>1</u> |
| Inventive step (IS) | Yes: Claims | |
| | No: Claims | <u>1-72, 77-93</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-72, 77-93</u> |
| | No: Claims | |
2. Citations and explanations
- see separate sheet**

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item IV

Lack of unity of invention

This Authority considers that the application does not meet the requirements of unity of invention and that there are 3 inventions covered by the claims indicated as follows:

1. claims: 1-72, 77-93
Binding proteins comprising regions from antibody E9 and modified versions thereof and related subject matter
2. claims: 94-165, 170-187
Binding proteins comprising regions from antibody A10 and modified versions thereof and related subject matter
3. claims: 73-77, 166-169
Compositions for the release of binding proteins and related subject matter

The present application addresses the following technical problems:

- 1) The provision of binding proteins toward DLL4
- 2) The provision of compositions for the release of binding proteins

The solutions to these problems embodied in the claims are:

- a)
 - i) Binding proteins comprising regions from antibody E9 and modified versions thereof
 - ii) Binding proteins comprising regions from antibody A10 and modified versions thereof and related subject matter
- b) A formulation comprising a binding protein, an ingredient and a polymeric carrier.

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

The technical relationship, and thus the common inventive concept within the meaning of Rule 13.2 PCT a priori linking the different alternative binding members and compositions encompassed by the present claims is that they relate to binding members. However, binding members, in particular towards DLL4 are known in the prior art (for example, see Ridgway et.al., 2006 and WO2008076379).

Such knowledge destroys said linking unit and since no other technical feature can be distinguished which in the light of the prior art (including common general knowledge in the field) could be regarded as a special common feature that defines a contribution over the prior art, the ISA is of the opinion that there is no single inventive concept (Rule 13.1 PCT) underlying the different inventions in the sense of rule 13.2 PCT.

Consequently, there is a lack of unity and the different inventions not belonging to a common inventive concept are formulated as different inventions pursuant to Article 17(3)(e) PCT.

The Applicant should note that for the purposes of search, all antibodies derived from the same parent antibody have been included in the appropriate invention relating thereto; however, since the underlying feature connecting the antibodies provided in the application is already known, i.e. antibodies capable of binding DLL4 with dissociation constants (Kd) in the sub-nanomolar range (for example, see Ridgway et.al., 2006), or such comprising a CDR with the sequence SSSYYWG (see WO2008076379 SEQ ID NO:180), each antibody claimed will be deemed to constitute a separate invention at the examination stage, irrelevant of the fact that said antibodies share partial structural features.

Since the applicant has not paid for the additional search of further inventions only the subject matter of invention 1 (Claims 1-72 and 77-93) has been researched by the ISA.

Re Item V

Reference is made to the following documents:

- D1 RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE05313, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006 (2006-12-21) , pages 1083-1087, XP002489428 ISSN: 0028-0836
- D2 WO 2008/076379 A2 (REGENERON PHARMA [US]; PAPADOPOULOS NICHOLAS J [US]; MARTIN JOEL H [US] 26 June 2008 (2008-06-26)

- D3 SAINSON ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB LNKD- DOI:10.1016/J.MOLMED.2007.07.002, vol. 13, no. 9, 14 September 2007 (2007-09-14) , pages 389-395, XP022245395 ISSN: 1471-4914
- D4 NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE05355, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006 (2006-12-21) , pages 1032-1037, XP002489427 ISSN: 0028-0836
- D5 WO 2008/060705 A2 (GENENTECH INC [US]; YAN MINHONG [US]; WU YAN [US]) 22 May 2008 (2008-05-22)
- D6 WO 2007/143689 A2 (GENENTECH INC [US]; YAN MINHONG [US]) 13 December 2007 (2007-12-13)
- D7 HOEY T ET AL: "DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency" CELL STEM CELL, CELL PRESS, US LNKD- DOI:10.1016/J.STEM.2009.05.019, vol. 5, no. 2, 7 August 2009 (2009-08-07) , pages 168-177, XP002564818 ISSN: 1934-5909 [retrieved on 2009-08-06]
- D8 US 2009/035308 A1 (GILL PARKASH [US] ET AL) 5 February 2009 (2009-02-05)
- D9 GB 2 449 354 A (SMART TARGETING LTD [GB]) 19 November 2008 (2008-11-19)
- D10 WO 2008/042236 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS INC [US]; GURNEY AUSTIN [US]; HOEY TIMOTHY [US]) 10 April 2008 (2008-04-10)
- D11 WO 2007/070671 A2 (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21)

1 **Novelty**

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 1 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

- 1.1 Document D2 discloses human antibodies or a fragment of a human antibody which specifically binds to human delta-like ligand 4 (hDLL4) and blocks hDLL4 binding to a Notch receptor. The human anti- hDLL4 antibody or antibody fragment binds hDLL4 with an affinity of ≈ 500 pM, as measured by surface plasmon resonance directed towards DLL4. One such antibody comprises SEQ ID NO:99 of the present application (SEQ ID NO:180).

D2 thus anticipates the novelty of present claim 1.

2 Inventive step

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-72, and 77-93 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

- 2.1 The document D1 (or alternatively D2) is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 2 and discloses that the anti-DLL4 antibody YW152F can effectively block the interaction of Notch with DLL4 but not other Notch ligands. The antibody has a K_d of 0.15 nM towards human DLL4 and 0.09 nM towards marine DLL4, respectively.

The subject-matter of claim 2 therefore differs from this known D1 in that a multitude of DLL4-binding proteins characterised by one specific CDR sequence are claimed.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of alternative binding proteins for DLL4.

The solution proposed in claim 2 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons.

The antibodies of claim 1 are defined by partial structural elements/sequences that allow for a less than 100% identity. In view of the importance of the role played by each single amino acid in the binding of an antibody to its target, especially at the level of its CDRs, a claim to an antibody that is structurally characterised by less than the full sequence and designated framework of all the CDRs does not represent the solution to the technical problem described in claim 2, i.e. that all the claimed combinations would bind to DLL4 with any significant affinity, and can therefore not be considered to involve an inventive step.

2.2 The same reasoning applies to claims 3-5,13,15,17,19,22, and 31 to peptide sequence combinations and claims 54-72 relating to nucleic acids encoding the antibodies, vectors and host cells and their use for the production of the antibodies which is common practice.

2.3 The Applicant should note that given the fact that methods to obtain monoclonal antibodies, including human, chimeric or humanized monoclonal antibodies, directed against every well known and defined antigen, and to screen said antibodies in order to select those presenting specific characteristics such as improved affinity, are considered routine in the art, the subject-matter of the present application cannot be considered as inventive.

An inventive step could only be acknowledged if the antibodies would **demonstrate** unexpected properties or if it had been unexpected that such antibodies could be produced at all, which does not seem to be the case for the antibodies claimed since the antibodies claimed are merely affinity-matured using standard methods to achieve affinities already demonstrated in prior art antibodies. In the present case, the Applicants have demonstrated cross-species binding of at least some of the antibodies claimed (Table 22); however, this does not appear to be an unexpected property since such antibodies have already been demonstrated (see D1) and there is no evidence provided that such differences in DLL4 exist between species as to result in a technical problem to be overcome in this respect.

2.4 Claims 77-93 relating to compositions and methods of treatment comprising the antibodies claimed cannot be considered inventive in light of the prior art D1-D11 which all disclose the use of anti-DLL4 for the inhibition of tumour growth.

The Applicant should note that the mere allegation of an effect (in the present case the suitability of anti-DLL4 for the treatment of **specific** cancers) is not sufficient to support inventive step. For "2nd medical use claims" the absence of any in-vitro or in-vivo data demonstrating the desired effect means that the problem underlying the invention cannot be considered to be solved. In the present case the application merely confirms previous findings that anti-DLL4 antibodies possess general anti-tumour activity, in particular using an animal model incorporating a lung cancer xenograft. The Applicant should also note that even this technical effect could only be acknowledged for those antibodies demonstrated in Table 31.

- 2.5 Claims 6-12,14,16,17,18,20,21,23-30, and 32-53 are merely several straight-forward possibilities from which the skilled person would select, in accordance with circumstances, without the exercise of inventive skill, in order to solve the problem posed and thus lack an inventive step.

Re Item VI

Certain documents cited

- D12 WO 2009/124931 A2 (ABLYNX NV [BE]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOTT [BE]; DE HAARD JOHANNES JO) 15 October 2009 (2009-10-15)
- D13 WO 2009/134776 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; MORGAN-LAPPE SUSAN E [US]; REILLY) 5 November 2009 (2009-11-05)
- D14 WO 2010/032060 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; MEDIMMUNE LTD [GB]; BEDIAN VAHE [US]; FOLTZ IAN [C]) 25 March 2010 (2010-03-25)

The above cited document discloses similar subject-matter to the present application and thus may become relevant at a later stage. For example, D14 would appear to disclose antibodies comprising at least one of the CDRs of claim 1.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

3 Clarity and disclosure

The application does not meet the requirements of Articles 5 and/or 6 PCT, because the following claims are not clear and/or lack disclosure:

- 3.1 The antibodies of claims 1-5,13,15,17,19,22, and 31 are defined by partial structural elements. The sequences allow for a less than 100% identity. In view of the importance of the role played by each single amino acid in the binding of an antibody to its target, especially at the level of its CDRs, a claim to an antibody which is structurally characterised by less than the full sequence of all the CDRs cannot be seen as being sufficiently disclosed (Article 5 PCT). The same reasoning applies to claims 54-72 relating to nucleic acids encoding the antibodies, vectors and host cells and their use for the production of the antibodies which is common practice.

3.2 In order to fulfil the requirements of Article 5 PCT the sufficiency of disclosure must be satisfied at the effective date of the patent, i.e. on the basis of the information in the patent application together with common general knowledge then available to the skilled person. Where a therapeutic application is claimed in the form of the use of a substance or composition for the manufacture of a medicament for a defined therapeutic application, attaining the claimed therapeutic effect is a functional feature of the claim. As a consequence, under Article 5 PCT the application must disclose the suitability of the product to be manufactured for the claimed therapeutic application. Since this is not the case for the present claims 81-93, the requirements of Article 5 PCT are not met.

3.3 Claims 1-47 relate to 'binding proteins', however, the term 'CDR' also used in said claims is only considered to relate to certain specific sequences within the variable regions of antibodies in the context of the framework as defined by Kabatt. Claims 1-47 thus lack clarity.

3.4 It is not clear in claims 78,81,82 and 93 what such diseases fall under the category of disorders in which DLL4 activity is detrimental: the therapeutic application is functionally defined by a mechanism of action which does not allow any practical application in the form of a defined, real treatment of a pathological condition (disease).

The objection could be overcome by either introducing into the claims a list of pathological conditions (diseases) cited in the application, or by showing that means are available which would allow the skilled person to recognise which additional condition/s would fall within the functional definition.

3.5 Although claims 1,31,48 to products, and 80-82, and 93 to methods of treatment have been drafted as separate independent claims, they appear to relate effectively to the same subject-matter and to differ from each other only with regard to the definition of the subject-matter for which protection is sought and/or in respect of the terminology used for the features of that subject-matter. The aforementioned claims therefore lack conciseness and as such do not meet the requirements of Article 6 PCT.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4

Resumen, Objeto y Finalidad de la Invención

Se describen proteínas de unión a DLL4 mejoradas, incluyendo anticuerpos, anticuerpos de CDR injertada, anticuerpos humanos, y fragmentos de unión a DLL4 de los mismos, proteínas que se unen a DLL4 con alta afinidad, y proteínas de unión a DLL4 que neutralizan la actividad de DLL4. Las proteínas de unión a DLL4 son útiles para el tratamiento o prevención de cánceres y tumores y especialmente para el tratamiento o prevención de la angiogénesis de tumor y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis tales como neovascularización ocular, o enfermedades independientes de la angiogénesis caracterizadas por la expresión o actividad aberrante de DLL4 tales como trastornos autoinmunes que incluyen esclerosis.

Sector: Industria farmacéutica, específicamente proteínas de unión a DLL4 y composiciones farmacéuticas que las contienen, capaces de inhibir, prevenir o tratar cánceres, tumores y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4

Referencia con Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Americana Provisional No. 61/238,152, presentada en Agosto 29 de 2009, y a la Solicitud Americana Provisional No. 61/261,728, presentada en Noviembre 16 de 2009.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el desarrollo y uso de proteínas de unión a DLL4 mejoradas y usos de las mismas en la inhibición, prevención y/o tratamiento de cánceres, tumores, y/u otras enfermedades dependientes de angiogénesis tales como neovascularización ocular, o enfermedades independientes de angiogénesis caracterizadas por la expresión o actividad aberrante de DLL4 tales como trastornos autoinmunes.

Antecedentes de la invención

Se requiere la comunicación célula-a-célula para muchos procesos biológicos tales como diferenciación, proliferación y homeóstasis. Un sistema utilizado por un amplio rango de eucariotes es la ruta de señalización Notch. Esta ruta, especialmente el receptor Notch, también es crítica para la angiogénesis de tumor funcional. Así, la inhibición de la función del receptor Notch, bloqueo del receptor Notch, y/o bloqueo de la ruta de señalización Notch son estrategias potenciales para las composiciones y terapias anticáncer. Se ha probado que los inhibidores de molécula pequeña del receptor Notch son tóxicos porque suprimen la expresión de tejido tipo salvaje (normal) de los receptores Notch en todo el cuerpo. Así, diferentes miembros de la ruta se

señalización Notch deben ser considerados como objetivos potenciales para terapéuticos.

Un ligando de vasculatura para el receptor Notch es Delta 4 o tipo Delta-4 (DLL4). Expresado en gran medida en la vasculatura, DLL4 es crítico para el desarrollo vascular (Yan et al., *Clin. Cancer Res.*, 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1313-1318 (2000); Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1343-1352 (2000)). Los ratones heterocigotos para DLL4 son embrionalmente letales debido a defectos importantes en el desarrollo vascular (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Duarte et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2469-2473 (2004)). La expresión de DLL4 puede ser inducida por VEGF (Liu et al., *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 14-25 (2003); Lobov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3219-3224 (2007)). A su vez, DLL4 puede regular negativamente la señalización de VEGF, en parte mediante la reexpresión de VEGFR2 e induciendo VEGFR1 (Harrington et al., *Microvasc. Res.*, 75(2): 144-154 (2008); Suchting et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3225-3230 (2007)). La exquisita coordinación entre DLL4 y VEGF es esencial para la angiogénesis funcional.

Además de su papel fisiológico, DLL4 está regulado ascendentemente en los vasos sanguíneos de tumor (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos et al., *Differentiation*, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel et al., *Cancer Res.*, 65(19): 8690-8697 (2005); Patel et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006)). El bloqueo de DLL4 inhibió de manera potente el crecimiento de tumor primario en múltiples modelos (Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., *Nature*, 444(7122): 1083-1087 (2006); Sclafani et al., *Blood*, 109(11): 4753-4760 (2007)). La inhibición

de DLL4 fue incluso efectiva contra tumores que son resistentes a la terapia anti-VEGF. La inhibición combinacional tanto de DLL4 y VEGF proporcionó una actividad anti-tumor potenciada. De manera interesante, a diferencia de la inhibición de VEGF que reduce la formación de vasos de tumor, el bloqueo de DLL4 conduce a un aumento en la densidad de la vasculatura de tumor en donde los vasos son anormales, no puede soportar transporte de sangre eficiente, son efectivamente no funcionales. Así, DLL4 provee un objetivo potencial para el tratamiento del cáncer.

Existe una necesidad en la técnica de agentes terapéuticos capaces de marcar la ruta de señalización DLL4-Notch inhibiendo de esta forma, o incluso evitando la angiogénesis y crecimiento de tumor.

Resumen de la Invención

La invención provee proteínas que se unen a DLL4, incluyendo anticuerpos, anticuerpos de CDR injertada, y fragmentos de unión de los mismos, que son capaces de unirse a DLL4. Preferiblemente, una proteína de unión aquí descrita se une a DLL4 con alta afinidad. Más preferiblemente, una proteína de unión de acuerdo con la invención, es capaz de neutralizar DLL4. La invención también provee métodos para preparar y usar las proteínas de unión a DLL4, incluyendo proteínas de unión a DLL4 humano. De manera ventajosa, la invención elimina la necesidad de preparar proteínas de unión a DLL4 humanizadas, eliminando las complicaciones asociadas con proteínas de unión a DLL4 humanizadas.

Un aspecto de esta invención se relaciona con una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a DLL4 humano, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una o más CDR seleccionadas del grupo que consiste de:

CDR-H1 : X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO : 99), en donde;

X_1 es S o N;
 X_2 es S, G, o N;
 X_3 es S, N, T, G, o R;
 X_4 es Y;
 X_5 es Y o H;
 X_6 es W; y
 X_7 es G;

CDR-H: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16}
 (SEQ ID NO : 100, en donde;

X_1 es D;
 X_2 es I;
 X_3 es Y, N, o S;
 X_4 es Y;
 X_5 es T, N, A, I, S, o R;
 X_6 es G;
 X_7 es S, N, T, o G;
 X_8 es T;
 X_9 es Y;
 X_{10} es Y;
 X_{11} es N;
 X_{12} es P;
 X_{13} es S;
 X_{14} es L;
 X_{15} es K; y
 X_{16} es S, N, D, o G;

CDR-H3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 101), en donde;

X_1 es E, Y, F, Q, W, L, o A;
 X_2 es D, A, S, G, V, E, o N;
 X_3 es V, M, L, P, o A;
 X_4 es I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M, o E;
 X_5 es L, Y, F, o M;
 X_6 es R, G, S, Q, o A;
 X_7 es G;
 X_8 es G, A, o S;
 X_9 es S, A, L, V, R, o G;
 X_{10} es D; y
 X_{11} es Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q, o K;

CDR-L1: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 102), en donde;

X_1 es S;
 X_2 es G;
 X_3 es Q, E, o D;
 X_4 es R, S, G, M, K, L, o T;
 X_5 es L;
 X_6 es G;
 X_7 es D o E;
 X_8 es K;
 X_9 es Y;
 X_{10} es A o V; y
 X_{11} es S;

CDR-L2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 103), en donde;

X_1 es E o Q;
 X_2 es D;
 X_3 es S, L, T, A, E, o F;
 X_4 es K, T, N, Q, S, o M;

X₅ es R;
 X₆ es P; y
 X₇ es S;

y

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 104), en donde;

X₁ es Q;
 X₂ es A;
 X₃ es W;
 X₄ es D;
 X₅ es R, S, M, E, N, G, o K;
 X₆ es D o E;
 X₇ es T, V, A, S, o M;
 X₈ es G, A, o C; y
 X₉ es V.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno de una proteína de unión a DLL4 de la invención comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

residuos 31-37 de SEQ ID NO:1 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:1 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:1 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:111 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:111 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:111 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:117 (CDR-H1); SEQ ID NO:118 (CDR-H2); SEQ ID NO:119 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:121 (CDR-H1); SEQ ID NO:122 (CDR-H2); SEQ ID NO:123 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:125 (CDR-H1); SEQ ID NO:126 (CDR-H2); SEQ ID NO:127 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 129 (CDR-H1); SEQ ID NO:130 (CDR-H2); SEQ ID NO:131 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:133 (CDR-H1); SEQ ID NO:134 (CDR-H2); SEQ ID NO:135 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 137 (CDR-H1); SEQ ID NO:138 (CDR-H2); SEQ ID NO:139 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:141 (CDR-H1); SEQ ID NO:142 (CDR-H2); SEQ ID NO:143 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:145 (CDR-H1); SEQ ID NO:146 (CDR-H2); SEQ ID NO:147 (CDR-H3);

SEQ ID NO: 149 (CDR-H1); SEQ ID NO:150 (CDR-H2); SEQ ID NO:151 (CDR-H3);
SEQ ID NO:153 (CDR-H1); SEQ ID NO:154 (CDR-H2); SEQ ID NO:155 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 157 (CDR-H1); SEQ ID NO:158 (CDR-H2); SEQ ID NO:159 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 161 (CDR-H1); SEQ ID NO:162 (CDR-H2); SEQ ID NO:163 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 165 (CDR-H1); SEQ ID NO:166 (CDR-H2); SEQ ID NO:167 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 169 (CDR-H1); SEQ ID NO:170 (CDR-H2); SEQ ID NO:171 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 173 (CDR-H1); SEQ ID NO:174 (CDR-H2); SEQ ID NO:175 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 177 (CDR-H1); SEQ ID NO:178 (CDR-H2); SEQ ID NO:179 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 181 (CDR-H1); SEQ ID NO:182 (CDR-H2); SEQ ID NO:183 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 185 (CDR-H1); SEQ ID NO:186 (CDR-H2); SEQ ID NO:187 (CDR-H3);
SEQ ID NO:189 (CDR-H1); SEQ ID NO:190 (CDR-H2); SEQ ID NO:191 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 193 (CDR-H1); SEQ ID NO:194 (CDR-H2); SEQ ID NO:195 (CDR-H3);
SEQ ID NO: 197 (CDR-H1); SEQ ID NO:198 (CDR-H2); SEQ ID NO:199 (CDR-H3);
SEQ ID NO:201 (CDR-H1); SEQ ID NO:202 (CDR-H2); SEQ ID NO:203 (CDR-H3);
SEQ ID NO:205 (CDR-H1); SEQ ID NO:206 (CDR-H2); SEQ ID NO:207 (CDR-H3);
SEQ ID NO:209 (CDR-H1); SEQ ID NO:210 (CDR-H2); SEQ ID NO:211 (CDR-H3);
SEQ ID NO:213 (CDR-H1); SEQ ID NO:214 (CDR-H2); SEQ ID NO:215 (CDR-H3);
SEQ ID NO:217 (CDR-L1); SEQ ID NO:218 (CDR-L2); SEQ ID NO:219 (CDR-L3);
SEQ ID NO:221 (CDR-L1); SEQ ID NO:222 (CDR-L2); SEQ ID NO:223 (CDR-L3);
SEQ ID NO:225 (CDR-L1); SEQ ID NO:226 (CDR-L2); SEQ ID NO:227 (CDR-L3);
SEQ ID NO:229 (CDR-L1); SEQ ID NO:230 (CDR-L2); SEQ ID NO:231 (CDR-L3);
SEQ ID NO:233 (CDR-L1); SEQ ID NO:234 (CDR-L2); SEQ ID NO:235 (CDR-L3);
SEQ ID NO:237 (CDR-L1); SEQ ID NO:238 (CDR-L2); SEQ ID NO:239 (CDR-L3);
SEQ ID NO:241 (CDR-L1); SEQ ID NO:242 (CDR-L2); SEQ ID NO:243 (CDR-L3);
SEQ ID NO:245 (CDR-L1); SEQ ID NO:246 (CDR-L2); SEQ ID NO:247 (CDR-L3);
SEQ ID NO:249 (CDR-L1); SEQ ID NO:250 (CDR-L2); SEQ ID NO:251 (CDR-L3);
SEQ ID NO:253 (CDR-L1); SEQ ID NO:254 (CDR-L2); SEQ ID NO:255 (CDR-L3);
SEQ ID NO:257 (CDR-L1); SEQ ID NO:258 (CDR-L2); SEQ ID NO:259 (CDR-L3);
SEQ ID NO:261 (CDR-L1); SEQ ID NO:262 (CDR-L2); SEQ ID NO:263 (CDR-L3);
SEQ ID NO:265 (CDR-L1); SEQ ID NO:266 (CDR-L2); SEQ ID NO:267 (CDR-L3);
SEQ ID NO:269 (CDR-L1); SEQ ID NO:270 (CDR-L2); SEQ ID NO:271 (CDR-L3);
SEQ ID NO:273 (CDR-L1); SEQ ID NO:274 (CDR-L2); SEQ ID NO:275 (CDR-L3);
SEQ ID NO:277 (CDR-L1); SEQ ID NO:278 (CDR-L2); SEQ ID NO:279 (CDR-L3);
SEQ ID NO:281 (CDR-L1); SEQ ID NO:282 (CDR-L2); SEQ ID NO:283 (CDR-L3);
SEQ ID NO:285 (CDR-L1); SEQ ID NO:286 (CDR-L2); SEQ ID NO:287 (CDR-L3);
SEQ ID NO:289 (CDR-L1); SEQ ID NO:290 (CDR-L2); SEQ ID NO:291 (CDR-L3);

SEQ ID NO:293 (CDR-L1); SEQ ID NO:294 (CDR-L2); SEQ ID NO:295 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:297 (CDR-L1); SEQ ID NO:298 (CDR-L2); SEQ ID NO:299 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:301 (CDR-L1); SEQ ID NO:302 (CDR-L2); SEQ ID NO:303 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:305 (CDR-L1); SEQ ID NO:306 (CDR-L2); SEQ ID NO:307 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:309 (CDR-L1); SEQ ID NO:310 (CDR-L2); SEQ ID NO:311 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:313 (CDR-L1); SEQ ID NO:314 (CDR-L2); SEQ ID NO:315 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:334 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:334 (CDR-H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:334 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:335 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:335 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:335 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:336 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:336 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:336 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:337 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:337 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:337 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:338 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:338 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:338 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:339 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:339 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:339 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:340 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:340 (CDR-H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:340 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:341 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:341 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:341 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:342 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:342 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:342 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:343 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:343 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:343 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:344 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:344 (CDR-H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:344 (CDR-H3);
 residuos 24-34 de SEQ ID NO:345 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID
 NO:345 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:345 (CDR-L3);

residuos 31-37 de SEQ ID NO:346 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:346 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:346 (CDR-H3);
residuos 23-33 de SEQ ID NO:347 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:347 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:347 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:348 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:348 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:348 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:349 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:349 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:349 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:350 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:350 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:350 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:351 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:351 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:351 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:352 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:352 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:352 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:353 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:353 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:353 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:354 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:354 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:354 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:355 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:355 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:355 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:356 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:356 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:356 (CDR-H3);
residuos 23-33 de SEQ ID NO:357 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:357 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:357 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:358 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:358 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:358 (CDR-H3);
residuos 23-33 de SEQ ID NO:359 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:359 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:359 (CDR-L3);
residuos 31-37 de SEQ ID NO:360 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:360 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:360 (CDR-H3);

residuos 23-33 de SEQ ID NO:361 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:361 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:361 (CDR-L3).

En otra realización, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR reveladas anteriormente.

Preferiblemente, una proteína de unión a DLL4 de acuerdo con la invención comprende una o más CDR reveladas anteriormente. Más preferiblemente, la proteína de unión comprende tres o más CDR reveladas anteriormente. Lo más preferido, una proteína de unión a DLL4 de acuerdo con la invención comprende seis CDR descritas anteriormente, p.e., una CDR-H1, una CDR-H2, una CDR-H3, una CDR-L1, una CDR-L2, y una CDR-L3 descrita anteriormente.

En una realización preferida, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR seleccionadas del grupo que consiste de las secuencias reveladas anteriormente.

Más preferiblemente, la proteína de unión comprende 3 CDR seleccionada de un conjunto de CDR de dominio variable seleccionado del grupo siguiente.

Conjunto de CDR VH E9

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:1

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO: 1

CDR-H3 residuos 100-110 de SEQ ID NO:1

Conjunto de CDR VL E9

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:111

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:111

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO: 111

Conjunto de CDR VH E9.4

CDR-H1: SEQ ID NO:117

CDR-H2: SEQ ID NO:118

CDR-H3: SEQ ID NO:119

Conjunto de CDR VL E9.4

CDR-L1: SEQ ID NO:229

CDR-L2: SEQ ID NO:230

CDR-L3: SEQ ID NO:231

Conjunto de CDR VH E9.11

CDR-H1: SEQ ID NO: 121

CDR-H2: SEQ ID NO: 122

CDR-H3: SEQ ID NO:123

Conjunto de CDR VL E9.11

CDR-L1 : SEQ ID NO :233

CDR-L2: SEQ ID NO:234

CDR-L3: SEQ ID NO:235

Conjunto de CDR VH E9.14

CDR-H1: SEQ ID NO: 125

CDR-H2: SEQ ID NO:126

CDR-H3: SEQ ID NO:127

Conjunto de CDR VL E9.14

CDR-L1: SEQ ID NO:237

CDR-L2: SEQ ID NO:238

CDR-L3 : SEQ ID NO :239

Conjunto de CDR VH E9.17

CDR-H1: SEQ ID NO: 129

CDR-H2: SEQ ID NO: 130

CDR-H3: SEQ ID NO: 131

Conjunto de CDR VL E9.17

CDR-L1 : SEQ ID NO :241

CDR-L2: SEQ ID NO:242

CDR-L3: SEQ ID NO:243

Conjunto de CDR VH E9.18

CDR-H1: SEQ ID NO:133

CDR-H2: SEQ ID NO:134

CDR-H3: SEQ ID NO: 135

Conjunto de CDR VL E9.18

CDR-L1: SEQ ID NO:245

CDR-L2 : SEQ ID NO :246

CDR-L3 : SEQ ID NO :247

Conjunto de CDR VH E9.19

CDR-H1: SEQ ID NO:137

CDR-H2: SEQ ID NO: 138

CDR-H3: SEQ ID NO: 139

Conjunto de CDR VL E9.19

CDR-L1: SEQ ID NO:249

CDR-L2: SEQ ID NO:250

CDR-L3: SEQ ID NO:251

Conjunto de CDR VH E9.22

CDR-H1: SEQ ID NO:141

CDR-H2 : SEQ ID NO : 142

CDR-H3: SEQ ID NO:143

Conjunto de CDR VL E9.22

CDR-L1 : SEQ ID NO :253

CDR-L2: SEQ ID NO:254

CDR-L3 : SEQ ID NO :255

Conjunto de CDR VH E9.48

CDR-H1: SEQ ID NO: 145

CDR-H2: SEQ ID NO: 146

CDR-H3 : SEQ ID NO : 147

Conjunto de CDR VL E9.48

CDR-L1 : SEQ ID NO :257

CDR-L2: SEQ ID NO:258

CDR-L3: SEQ ID NO:259

Conjunto de CDR VH E9.65

CDR-H1: SEQ ID NO: 149

CDR-H2: SEQ ID NO:150

CDR-H3: SEQ ID NO: 151

Conjunto de CDR VL E9.65

CDR-L1 : SEQ ID NO :261

CDR-L2 : SEQ ID NO :262

CDR-L3: SEQ ID NO:263

Conjunto de CDR VH E9.66

CDR-H1: SEQ ID NO:153

CDR-H2: SEQ ID NO:154

CDR-H3: SEQ ID NO: 155

Conjunto de CDR VL E9.66

CDR-L1: SEQ ID NO:265

CDR-L2: SEQ ID NO:266

CDR-L3: SEQ ID NO:267

Conjunto de CDR VH E9.71

CDR-H1: SEQ ID NO:157

CDR-H2: SEQ ID NO:158

CDR-H3: SEQ ID NO: 159

Conjunto de CDR VL E9.71

CDR-L1 : SEQ ID NO :269

CDR-L2 : SEQ ID NO :270

CDR-L3: SEQ ID NO:271

Conjunto de CDR VH E9.13

CDR-H1: SEQ ID NO:161

CDR-H2 : SEQ ID NO : 162

CDR-H3 : SEQ ID NO : 163

Conjunto de CDR VL E9.13

CDR-L1: SEQ ID NO :217

CDR-L2: SEQ ID NO :218

CDR-L3 : SEQ ID NO :219

Conjunto de CDR VH E9.16

CDR-H1: SEQ ID NO:165

CDR-H2: SEQ ID NO: 166

CDR-H3: SEQ ID NO: 167

Conjunto de CDR VL E9.16

CDR-L 1 : SEQ ID NO :221

CDR-L2: SEQ ID NO:222

CDR-L3: SEQ ID NO:223

Conjunto de CDR VH E9.38

CDR-H1: SEQ ID NO: 169

CDR-H2 : SEQ ID NO : 170

CDR-H3: SEQ ID NO: 171

Conjunto de CDR VL E9.38

CDR-L1: SEQ ID NO:225

CDR-L2: SEQ ID NO:226

CDR-L3: SEQ ID NO:227

Conjunto de CDR VH E9.2B

CDR-H1: SEQ ID NO:173

CDR-H2: SEQ ID NO: 174

CDR-H3: SEQ ID NO: 175

Conjunto de CDR VL E9.2B

CDR-L1: SEQ ID NO:273

CDR-L2: SEQ ID NO:274

CDR-L3: SEQ ID NO:275

Conjunto de CDR VHE9.1F

CDR-H1: SEQ ID NO: 177

CDR-H2: SEQ D NO:178

CDR-H3: SEQ ID NO:179

Conjunto de CDR VLE9.1F

CDR-L1 : SEQ ID NO :277

CDR-L2: SEQ ID NO:278

CDR-L3 : SEQ ID NO :279

Conjunto de CDR VHE9.10H

CDR-H1: SEQ ID NO:181

CDR-H2: SEQ ID NO: 182

CDR-H3: SEQ ID NO:183

Conjunto de CDR VLE9.10H

CDR-L1: SEQ ID NO:301

CDR-L2: SEQ ID NO:302

CDR-L3: SEQ ID NO:303

Conjunto de CDR VH E9.5E

CDR-H1: SEQ ID NO: 185

CDR-H2: SEQ ID NO: 186

CDR-H3: SEQ ID NO:187

Conjunto de CDR VL E9.5E

CDR-L1: SEQ ID NO :293

CDR-L2: SEQ ID NO :294

CDR-L3: SEQ ID NO:295

Conjunto de CDR VHE9.10C

CDR-H1: SEQ ID NO: 189

CDR-H2: SEQ ID NO: 190

CDR-H3: SEQ ID NO: 191

Conjunto de CDR VLE9.10C

CDR-L1: SEQ ID NO:281

CDR-L2: SEQ ID NO:282

CDR-L3: SEQ ID NO:283

Conjunto de CDR VH E9.7E

CDR-H1: SEQ ID NO: 193

CDR-H2: SEQ ID NO: 194

CDR-H3: SEQ ID NO: 195

Conjunto de CDR VL E9.7E

CDR-L1: SEQ ID NO: 289

CDR-L2: SEQ ID NO: 290

CDR-L3: SEQ ID NO:291

Conjunto de CDR VHE9.12B

CDR-H1: SEQ ID NO: 197

CDR-H2: SEQ ID NO: 198

CDR-H3: SEQ ID NO: 199

Conjunto de CDR VL E9.12B

CDR-L1: SEQ ID NO:297

CDR-L2: SEQ ID NO:298

CDR-L3: SEQ ID NO :299

Conjunto de CDR VH E9.10E

CDR-H1: SEQ ID NO:201

CDR-H2: SEQ ID NO :202

CDR-H3: SEQ ID NO:203

Conjunto de CDR VLE9.10E

CDR-L1: SEQ ID NO:285

CDR-L2: SEQ ID NO:286

CDR-L3: SEQ ID NO:287

Conjunto de CDR VH E9.6A

CDR-H1: SEQ ID NO :205

CDR-H2: SEQ ID NO :206

CDR-H3: SEQ ID NO:207

Conjunto de CDR VL E9.6A

CDR-L1: SEQ ID NO:305

CDR-L2: SEQ ID NO:306

CDR-L3: SEQ ID NO:307

Conjunto de CDR VH E9.7A

CDR-H1: SEQ ID NO:209

CDR-H2: SEQ ID NO :210

CDR-H3: SEQ ID NO :211

Conjunto de CDR VL E9.7A

CDR-L1: SEQ ID NO:309

CDR-L2: SEQ ID NO:310

CDR-L3: SEQ ID NO:311

Conjunto de CDR VHE9.8H

CDR-H1: SEQ ID NO :213

CDR-H2: SEQ ID NO :214

CDR-H3: SEQ ID NO:215

Conjunto de CDR VL E9.8H

CDR-L1: SEQ ID NO:313

CDR-L2: SEQ ID NO:314

CDR-L3: SEQ ID NO:315

Conjunto de CDR VHE9.1

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:334

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:334

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:334

Conjunto de CDR VLE9.1

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:335

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:335

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:335

Conjunto de CDR VH E9-SE1

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:336

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:336

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:336

Conjunto de CDR VL E9-SE1

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:337

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:337

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:337

Conjunto de CDR VH E9-SE2

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:338

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:338

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:338

Conjunto de CDR VL E9-SE2

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:339

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:339

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:339

Conjunto de CDR VH E9-SE3

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:340

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:340

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:340

Conjunto de CDR VL E9-SE3

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:341

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:341

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:341

Conjunto de CDR VH E9-SE4

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:342

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:342

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:342

Conjunto de CDR VL E9-SE4

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:343

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:343

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:343

Conjunto de CDR VH E9-SE5

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:344

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:344

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:344

Conjunto de CDR VL E9-SE5

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:345

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:345

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:345

Conjunto de CDR VH E9-SE6

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:346

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:346

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:346

Conjunto de CDR VL E9-SE6

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:347

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:347

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:347

Conjunto de CDR VH E9-SE7

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:348

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:348

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:348

Conjunto de CDR VL E9-SE7

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:349

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:349

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:349

Conjunto de CDR VH E9-SE8

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:350

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:350

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:350

Conjunto de CDR VL E9-SE8

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:351

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:351

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:351

Conjunto de CDR VH E9-FR1

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:352

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:352

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:352

Conjunto de CDR VL E9-FR1

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:353

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:353

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:353

Conjunto de CDR VH E9-FR2

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:354

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:354

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:354

Conjunto de CDR VL E9-FR2

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:355

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:355

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:355

Conjunto de CDR VH E9.71

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:356

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:356

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:356

Conjunto de CDR VL E9.71

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:357

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:357

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:357

Conjunto de CDR VH E9.71(M)

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:358

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:358

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:358

Conjunto de CDR VL E9.71 (M)

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:359

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:359

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:359

Conjunto de CDR VH E9.71(L)

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:360

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:360

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:360

Conjunto de CDR VL E9.71 (L)

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:361

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:361

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:361

En otra realización, una proteína de unión comprende un conjunto de cadena pesada variable (VH) de 3 CDR seleccionadas de cualquier conjunto VH de 3 CDR del grupo anterior y un conjunto de cadena ligera variable (VL) de 3 CDR seleccionado de cualquier conjunto VL de 3 CDR del grupo anterior.

En aún otra realización, una proteína de unión comprende un conjunto llamado VH de 3 CDR y un conjunto llamado VL correspondiente de 3 CDR del siguiente grupo. Preferiblemente, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable seleccionados del grupo de conjuntos de CDR de dominio variable que consisten de:

- Conjunto de CDR VH E9 y Conjunto de CDR VL E9,
- Conjunto de CDR VH E9.4 y Conjunto de CDR VL E9.4,
- Conjunto de CDR VH E9.11 y Conjunto de CDR VL E9.11,
- Conjunto de CDR VH E9.14 y Conjunto de CDR VL E9.14,
- Conjunto de CDR VH E9.17 y Conjunto de CDR VL E9.17,
- Conjunto de CDR VH E9.18 y Conjunto de CDR VL E9.18,
- Conjunto de CDR VH E9.19 y Conjunto de CDR VL E9.19,
- Conjunto de CDR VH E9.22 y Conjunto de CDR VL E9.22,
- Conjunto de CDR VH E9.48 y Conjunto de CDR VL E9.48,
- Conjunto de CDR VH E9.65 y Conjunto de CDR VL E9.65,
- Conjunto de CDR VH E9.66 y Conjunto de CDR VL E9.66,
- Conjunto de CDR VH E9.71 y Conjunto de CDR VL E9.71,
- Conjunto de CDR VH E9.13 y Conjunto de CDR VL E9.13,
- Conjunto de CDR VH E9.16 y Conjunto de CDR VL E9.16,
- Conjunto de CDR VH E9.38 y Conjunto de CDR VL E9.38,
- Conjunto de CDR VH E9.2B y Conjunto de CDR VL E9.2B,
- Conjunto de CDR VH E9.1F y Conjunto de CDR VL E9.1F,

Conjunto de CDR VH E9.10H y Conjunto de CDR VL E9.10H,
 Conjunto de CDR VH E9.5E y Conjunto de CDR VL E9.5E,
 Conjunto de CDR VH E9.10C y Conjunto de CDR VL E9.10C,
 Conjunto de CDR VH E9.7E y Conjunto de CDR VL E9.7E,
 Conjunto de CDR VH E9.12B y Conjunto de CDR VL E9.12B,
 Conjunto de CDR VH E9.10E y Conjunto de CDR VL E9.10E,
 Conjunto de CDR VH E9.6A CDR y Conjunto de CDR VL E9.6A,
 Conjunto de CDR VH E9.7A CDR y Conjunto de CDR VL E9.7A,
 Conjunto de CDR VH E9.8H y Conjunto de CDR VL E9.8H,
 Conjunto de CDR VH E9-SE1 y Conjunto de CDR VL E9-SE1,
 Conjunto de CDR VH E9-SE2 y Conjunto de CDR VL E9-SE2,
 Conjunto de CDR VH E9-SE3 y Conjunto de CDR VL E9-SE3,
 Conjunto de CDR VH E9-SE4 y Conjunto de CDR VL E9-SE4,
 Conjunto de CDR VH E9-SE5 y Conjunto de CDR VL E9-SE5,
 Conjunto de CDR VH E9-SE6 y Conjunto de CDR VL E9-SE6,
 Conjunto de CDR VH E9-SE7 y Conjunto de CDR VL E9-SE7,
 Conjunto de CDR VH E9-SE8 y Conjunto de CDR VL E9-SE8,
 Conjunto de CDR VH E9-FR1 y Conjunto de CDR VL E9-FR1,
 Conjunto de CDR VH E9-FR2 y Conjunto de CDR VL E9-FR2,
 Conjunto de CDR VH E9.71 y Conjunto de CDR VL E9.71,
 Conjunto de CDR VH E9.71(M) y Conjunto de CDR VL E9.71(M), y
 Conjunto de CDR VH E9.71(L) y Conjunto de CDR VL E9.71(L).

En aún otra realización, una proteína de unión descrita anteriormente comprende además un marco aceptor humano. Preferiblemente, el marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

secuencias de marco aceptor de cadena pesada SEQ ID NOS:6-22,
 secuencias aceptoras de cadena pesada SEQ ID NOS:35-62,

secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:23-34, y
secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:63-98.

En otra realización una proteína de unión descrita anteriormente comprende un marco aceptor humano, que comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco, en la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano, y que comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

En otra realización una proteína de unión aquí descrita comprende un marco aceptor humano que comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

- un residuo adyacente a una CDR;
- un residuo de sitio de glicosilación;
- un residuo raro;
- un residuo capaz de interactuar con DLL4 humano
- un residuo canónico;
- un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera;
- un residuo dentro de una zona Vernier; y
- un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada definida por Chothia y un marco de cadena pesada definida primero por Kabat.

Preferiblemente, el residuo clave se selecciona del grupo que consiste de: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L,

4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L, 95L.

En otra realización, una proteína de unión aquí descrita comprende un dominio variable humano de consenso.

En una realización preferida, una proteína de unión descrita anteriormente comprende al menos un dominio variable que tiene secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS:1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, y 361.

En otra realización, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen las secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 1 y 111, SEQ ID NOS: 116 y 228, SEQ ID NOS: 120 y 232, SEQ ID NOS: 124 y 236, SEQ ID NOS: 128 y 240, SEQ ID NOS: 132 y 244, SEQ ID NOS: 136 y 248, SEQ ID NOS: 140 y 252, SEQ ID NOS: 144 y 256, SEQ ID NOS: 148 y 260, SEQ ID NOS: 152 y 264, SEQ ID NOS: 156 y 268, SEQ ID NOS: 160 y 216, SEQ ID NOS: 164 y 220, SEQ ID NOS: 168 y 224, SEQ ID NOS: 172 y 272, SEQ ID NOS: 176 y 276, SEQ ID NOS: 180 y 300, SEQ ID NOS: 184 y 292, SEQ ID NOS: 188 y 280, SEQ ID NOS: 192 y 288, SEQ ID NOS: 196 y 296, SEQ ID NOS: 200 y 284, SEQ ID NOS: 204 y 304, SEQ ID NOS: 208 y 308, SEQ ID NOS: 212 y 312, SEQ ID NOS: 334 y 335, SEQ ID NOS: 336 y 337, SEQ ID NOS: 338 y 339, SEQ ID NOS: 340 y 341, SEQ ID NOS: 342 y 343, SEQ ID NOS: 344 y 345, SEQ ID NOS: 346 y 347, SEQ ID

NOS: 348 y 349, SEQ ID NOS: 350 y 351, SEQ ID NOS: 352 y 353, SEQ ID NOS: 354 y 355, SEQ ID NOS: 356 y 357, SEQ ID NOS: 358 y 359, SEQ ID NOS: 360 y 361.

En una realización, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende dominio variable de cadena pesada (V_H), preferiblemente en donde el V_H comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, y 360.

En aún otra realización, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de cadena ligera (un V_L), en donde preferiblemente, el V_L comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, y 361.

En una realización preferida, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende un V_H y un V_L , preferiblemente en donde V_H y V_L son cada uno aquellas secuencias reveladas anteriormente.

En otra realización, la invención provee una proteína de unión capaz de unirse a DLL-4 humano, dicha proteína de unión comprende:

una región constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3;

una región ligera constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5;

una región pesada variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 5 354, 356, 358, y 360; y

Una región ligera variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 10 353, 355, 357, 359, y 361.

Otro aspecto de la invención se relaciona con una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a DLL4 humano, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una o más CDR seleccionadas del grupo que consiste de:

CDR-H1: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO: 105), en donde;

X_1 es S, N, o D;

X_2 es H o Y;

X_3 es W;

X_4 es M;

X_5 es S o H;

CDR-H2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}
(SEQ ID NO: 106), en donde;

X_1 es I, D, M, o T;

X_2 es I;

X₃ es S;
X₄ es Y, N, S, Q, V, T, H, o D;
X₅ es D;
X₆ es G;
X₇ es S, R, I, T, G, K, H, o N;
X₈ es N, Y, S, I, o T;
X₉ es K, M, N, Q, E, T, R, S, A, o L;
X₁₀ es Y, D, o E;
X₁₁ es S o Y;
X₁₂ es A;
X₁₃ es D;
X₁₄ es S;
X₁₅ es V;
X₁₆ es K; y
X₁₇ es G;

CDR-H3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 107), en donde;

X₁ es A;
X₂ es G, A, o R;
X₃ es G;
X₄ es G, S, o A;
X₅ es N;
X₆ es V o M;
X₇ es G;
X₈ es F, L, Y, o M;
X₉ es D; y
X₁₀ es I, S, o L;

CDR-L1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO: 108), en donde;

X₁ es S;

X₂ es A o G;
X₃ es D;
X₄ es K, N, L, Q, M, E, S, T, G, o D;
X₅ es L;
X₆ es G;
X₇ es T, S, N, A, G, o E;
X₈ es K, Q, N, o R;
X₉ es Y;
X₁₀ es V o I; y
X₁₁ es S;

CDR-L2 X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 109), en donde;

X₁ es Q;
X₂ es D;
X₃ es A, G, W, S, o D;
X₄ es K, M, Q, N, L, T, I, o E;
X₅ es R;
X₆ es P; y
X₇ es S;

y

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 110), en donde;

X₁ es Q;
X₂ es S o A;
X₃ es W;
X₄ es D;
X₅ es R, S, Q, P, A, V, W, o M;
X₆ es S, G, I, N, R, o T;
X₇ es D o G;
X₈ es V, A, P, o E; y
X₉ es V.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno de una proteína de unión a DLL4 de la invención comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

residuos 31-35 de SEQ ID NO:112 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:112 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:112 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:113 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:113 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:113 (CDR-L3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:316 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:316 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:316 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:317 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:317 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:317 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:318 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:318 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:318 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:319 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:319 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:319 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:320 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:320 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:320 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:321 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:321 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:321 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:322 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:322 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:322 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:323 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:323 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:323 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:324 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:324 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:324 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:325 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:325 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:325 (CDR-H3);

residuos 31-35 de SEQ ID NO:326 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:326 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:326 (CDR-H3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:327 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:327 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:327 (CDR-L3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:328 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:328 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:328 (CDR-L3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:329 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:329 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:329 (CDR-L3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:330 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:330 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:330 (CDR-L3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:331 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:331 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:331 (CDR-L3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:332 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:332 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:332 (CDR-L3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:333 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:333 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:333 (CDR-L3).

En otra realización, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR reveladas anteriormente.

Preferiblemente, una proteína de unión a DLL4 de acuerdo con la invención comprende una o más CDR revelada anteriormente. Más preferiblemente, la proteína de unión comprende tres o más CDR reveladas anteriormente. Lo más preferido, una proteína de unión a DLL4 de acuerdo con la invención comprende seis CDR descritas anteriormente, p.e., una CDR-H1, una CDR-H2, una CDR-H3, una CDR-L1, una CDR-L2, y una CDR-L3 descrita anteriormente.

En una realización preferida, la proteína de unión comprende al menos 3 CDR seleccionadas del grupo que consiste de las secuencias reveladas anteriormente.

En otra realización preferida, una proteína de unión comprende 3 CDR seleccionadas de un conjunto de CDR de dominio variable seleccionadas del siguiente grupo.

Conjunto de CDR VH A10

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:112

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:112

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:112

Conjunto de CDR VL A10

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:113

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:113

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO: 113

Conjunto de CDR VH A10.3

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:316

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:316

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:316

Conjunto de CDR VL A10.3

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:327

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:327

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:327

Conjunto de CDR VH A10.K30

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:317

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:317
CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:317

Conjunto de CDR VH A10.K42

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:318
CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:318
CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:318

Conjunto de CDR VH A10.9A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:319
CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:319
CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:319

Conjunto de CDR VH A10.8A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:320
CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:320
CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:320

Conjunto de CDR VH A10.1A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:321
CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:321
CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:321

Conjunto de CDR VH A10.5D

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:322
CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:322
CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:322

Conjunto de CDR VH A10.3A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:323

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:323

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:323

Conjunto de CDR VL A10.3A

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:330

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:330

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:330

Conjunto de CDR VH A10.6B

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:324

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:324

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:324

Conjunto de CDR VL A10.6B

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:331

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:331

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:331

Conjunto de CDR VH A10.3D

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:325

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:325

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:325

Conjunto de CDR VL A10.3D

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:332

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:332

CDR-L3 : residuos 88-96 de SEQ ID NO:332

Conjunto de CDR VH A10.4C

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:326

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:326

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:326

Conjunto de CDR VL A10.4C

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:333

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:333

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:333

Conjunto de CDR VL A10.L45

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:328

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:328

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:328

Conjunto de CDR VL A10.L73

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:329

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:329

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:329

En otra realización, una proteína de unión comprende un conjunto de cadena pesada variable (VH) de 3 CDR seleccionada de cualquier conjunto VH de 3 CDR del grupo anterior y un conjunto de cadena ligera variable (VL) de 3 CDR seleccionado de cualquier conjunto de VL de 3 CDR en el grupo anterior.

En aún otra realización, una proteína de unión comprende un conjunto llamado VH de 3 CDR y un conjunto llamado VL de 3 CDR correspondiente, del grupo siguiente. Preferiblemente, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable seleccionados del grupo de conjuntos de CDR de dominio variable que consiste de:

Conjunto de CDR VH A10 y Conjunto de CDR VL A10;

Conjunto de CDR VH A10.3 y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.3A y Conjunto de CDR VL A10.3A;
 Conjunto de CDR VH A10.6B y Conjunto de CDR VL A10.6B;
 Conjunto de CDR VH A10.3D y Conjunto de CDR VL A10.3D;
 Conjunto de CDR VH A10.4C y Conjunto de CDR VL A10.4C;
 Conjunto de CDR VH A10.K30 y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.K42 y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.3 y Conjunto de CDR VL A10.L45;
 Conjunto de CDR VH A10.3 y Conjunto de CDR VL A10.L73;
 Conjunto de CDR VH A10.9A y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.8A y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.1A y Conjunto de CDR VL A10.3; y
 Conjunto de CDR VH A10.5D y Conjunto de CDR VL A10.3.

En aún otra realización, una proteína de unión descrita anteriormente comprende además un marco aceptor humano. Preferiblemente, el marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

secuencias de marco aceptor de cadena pesada SEQ ID NOS:6-22,
 secuencias aceptoras de cadena pesada SEQ ID NOS:35-62,
 secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:23-34, y
 secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:63-98.

En otra realización, una proteína de unión descrita anteriormente comprende un marco aceptor humano, que comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano y que comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

En otra realización, una proteína de unión aquí descrita comprende un marco aceptor humano que comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

- un residuo adyacente a una CDR;
- un residuo de sitio de glicosilación;
- un residuo raro;
- un residuo capaz de interactuar con DLL4 humano
- un residuo canónico;
- un residuo de contacto entre una región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera;
- un residuo dentro de una zona Vernier; y
- un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada primero definido por Kabat.

Preferiblemente, el residuo clave es seleccionado del grupo que consiste de: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L, 95L.

En otra realización, una proteína de unión aquí descrita comprende un dominio variable humano de consenso.

En una realización preferida, una proteína de unión descrita anteriormente comprende al menos un dominio variable que tiene secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328, y 329.

En otra realización, una proteína de unión descrita anteriormente comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de: SEQ ID NOS: 112 y 113, SEQ ID NOS:316 y 327, SEQ ID NOS:323 y 330, SEQ ID NOS:324 y 331, SEQ ID NOS:325 y 332, y SEQ ID NOS:326 y 333.

En una realización, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H), en donde preferiblemente el V_H comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, y 326.

En ya otra realización, una proteína de unión de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de cadena ligera (un V_L), en donde preferiblemente el V_L comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332, y 333.

En otra realización, la invención provee una proteína de unión capaz de unirse a DLL-4 humano, dicha proteína de unión comprende:

una región pesada constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3;

una región ligera constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5;

una región pesada variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: SEQ ID NOS: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, y 326; y

una región ligera variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332, y 333.

De acuerdo con la invención, los dominios pesados variables (VH) y los dominios ligeros variables (VL) de las proteínas de unión a DLL4 aquí descritos pueden ser también mezclados usando técnicas recombinantes disponibles en la técnica para generar y seleccionar proteínas de unión a DLL4 adicionales que comprenden varias combinaciones de los dominios VH y VL aquí descritos.

En una realización preferida, una proteína de unión a DLL4 de acuerdo con la invención se une a DLL4 humano (hu DLL4) y al menos una especie diferente de DLL4. Más preferiblemente, una proteína de unión a DLL4 aquí descrita se une a DLL4 humano y un DLL4 seleccionado del grupo que consiste de: un DLL4 de ratón (mu DLL4), un DLL4 de mono cynomolgus (cynomolgus DLL4, cyno DLL4), un DLL4 de rata, y combinaciones de los mismos.

En otra realización, una proteína de unión a DLL4 es un anticuerpo totalmente humano o porción de unión a antígeno del mismo.

En otra realización, una proteína de unión a DLL4 es un anticuerpo de CDR injertada. Más preferiblemente, una proteína de unión a DLL4 es un anticuerpo de CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo que comprende una o más CDR descritas anteriormente.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo de CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable descrito anteriormente. Más preferiblemente, un anticuerpo de CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo comprende dos dominios variables descritos anteriormente. Preferiblemente, el anticuerpo de CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo comprende un marco aceptor humano. Más preferiblemente, el marco aceptor humano es uno cualquiera de los marcos aceptores humanos descritos anteriormente.

Más preferiblemente, una proteína de unión es capaz de neutralizar una actividad de un DLL4 seleccionado del grupo que consiste de DLL4 humano, DLL4 de ratón, DLL4 de mono cynomolgus, DLL4 de rata, y combinaciones de los mismos. Al evaluar la neutralización de la actividad de DLL4, se puede evaluar mediante varios ensayos in vitro e in vivo conocidos en la técnica. Los parámetros ejemplares para evaluar la neutralización de la actividad de DLL4 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que inhiben la interacción de DLL4 con el receptor Notch, y/o ruta de señalización Notch con valores de IC_{50} de aproximadamente al menos 10^{-6} M; al menos 10^{-7} M, o al menos 10^{-8} M.

En una realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (K_{on}) a DLL4 de al menos aproximadamente $10^2 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$; o al menos aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (K_{on}) a DLL4 entre $10^2 M^{-1} s^{-1}$ a $10^3 M^{-1} s^{-1}$; entre $10^3 M^{-1} s^{-1}$ a $10^4 M^{-1} s^{-1}$; entre $10^4 M^{-1} s^{-1}$ a $10^5 M^{-1} s^{-1}$; o entre $10^5 M^{-1} s^{-1}$ a $10^6 M^{-1} s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de disociación (K_{off}) para DLL4 de máximo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; o máximo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de disociación (K_{off}) a DLL4 de $10^{-3}s^{-1}$ a $10^{-4}s^{-1}$; de $10^{-4}s^{-1}$ a $10^{-5}s^{-1}$; o de $10^{-5}s^{-1}$ a $10^{-6}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a DLL4 de máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; o máximo 10^{-13} M. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a DLL4 de 10^{-7} M a 10^{-8} M; de 10^{-8} M a 10^{-9} M; de 10^{-9} M a 10^{-10} M; de 10^{-10} a 10^{-11} M; de 10^{-11} M a 10^{-12} M; o de 10^{-12} a M 10^{-13} M.

Una realización de la invención provee un constructo de anticuerpo que comprende una cualquiera de las proteínas de unión a DLL4 reveladas anteriormente y un polipéptido enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina. En una realización preferida, un constructo de anticuerpo de acuerdo con la invención es seleccionado del grupo que consiste de: una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de CDR injertada, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$, un Fv, un Fv enlazado a disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio sencillo, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico dual, y un anticuerpo biespecífico.

En una realización preferida, un constructo de anticuerpo de la invención comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana, y mutantes de los isotipos Ig anteriores que pueden alterar la unión del receptor Fc gamma, unión de FcRn, unión de C1q y pueden alterar las propiedades farmacocinéticas y/o funciones efectoras de Fc.

En otra realización, un constructo de anticuerpo está glicosilado. Preferiblemente, la glicosilación es un patrón de glicosilación humano.

En otra realización, una proteína de unión a DLL4 aquí descrita está conjugada a un agente. Los conjugados de proteína de unión de la invención incluyen conjugados de anticuerpo en los cuales un constructo de anticuerpo aquí descrito está conjugado a un agente. Preferiblemente, el agente es seleccionado del grupo que consiste de: una molécula de inmunoadhesión, un agente de representación gráfica, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una realización preferida, el agente de representación gráfica es seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminescente, una etiqueta bioluminescente, un marcador magnético, y biotina. Más preferiblemente, el agente de representación gráfica es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste de: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm . En una realización preferida, el agente terapéutico o citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de: un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra realización, una proteína de unión a DLL4, un constructo de anticuerpo, o un conjugado de proteína de unión (incluyendo conjugados de anticuerpo) revelado anteriormente, existe como un cristal. Preferiblemente, el cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo. En una realización preferida, tal proteína de unión cristalizada, constructo de anticuerpo cristalizado, o conjugado de anticuerpo cristalizado tiene una vida media in vivo mayor que su contraparte soluble. En otra realización preferida, la proteína de unión cristalizada, constructo de anticuerpo cristalizado, o conjugado de proteína de unión cristalizada (incluyendo conjugado de anticuerpo) retiene la actividad biológica después de la cristalización.

Un aspecto de la invención se relaciona con un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína de unión a DLL4, un constructo de anticuerpo, un conjugado de anticuerpo de unión a DLL4, o porción de unión a DLL4 del mismo. Se prefiere particularmente un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de: un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una CDR-H1, una CDR-H2, o una CDR-H3 descrita anteriormente; un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende una CDR-L1, una CDR-L2, o una CDR-L3 descrita anteriormente; o una combinación de ambos polipéptidos.

Una realización adicional provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado revelado anteriormente. En una realización preferida, el vector es seleccionado del grupo que consiste de: pcADN, pTT (Durocher et al., *Nucl. Acids Res.*, 30(2e9): 1-9 (2002)), pTT3 (pTT con sitios de clonación múltiple adicionales), pEFBOS (Mizushima et al., *Nucl. Acids. Res.*, 18 (17): 5322 (1990)), pHybE, pBV, pJV, y pBJ, y cualquier otro vector de expresión adecuado para células procarióticas o eucarióticas.

En otro aspecto de la invención se provee una célula hospedera transformada con el vector revelado anteriormente. La célula hospedera puede ser célula procariótica o eucariótica. Una célula hospedera procariótica preferida es *Escherichia coli*. Preferiblemente, la célula eucariótica es seleccionada del grupo que consiste de: una célula de protisto, una célula animal, una célula de planta, y una célula fúngica. Más preferiblemente, la célula hospedera es una célula mamífera que incluye, pero no se limita a, células CHO y COS. Una célula fúngica preferida es, pero no se limita a, *Saccharomyces cerevisiae*. Una célula de insecto preferida es una célula Sf9.

Otro aspecto de la invención provee un método para producir una proteína de unión que se une a DLL4 humano que comprende el paso de cultivar una cualquiera de las células hospederas reveladas anteriormente, en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a DLL4 humano. Otra realización provee una proteína de unión producida de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Una realización provee una composición para la liberación de una proteína de unión a DLL4 de acuerdo con la invención, en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión a DLL4 cristalizada, constructo de anticuerpo cristalizado, o conjugado de proteína de unión cristalizada (incluyendo conjugados de anticuerpo) como se reveló anteriormente, y un ingrediente, y además al menos un vehículo polimérico. Preferiblemente, el vehículo polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (amino ácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilen glicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfazeno], poli (orto ésteres), poli

(vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maléico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. Preferiblemente, el ingrediente es seleccionado del grupo que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilen glicol y polietilen glicol. Otra realización provee un método para el tratamiento de un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición que comprende una proteína de unión a DLL4 cristalizada, un constructo de anticuerpo cristalizado, o un conjugado de proteína cristalizada (incluyendo conjugados de proteína) revelados anteriormente.

La invención también provee una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a DLL4, un constructo de anticuerpo, o un conjugado de proteína de unión (incluyendo conjugados de anticuerpo) revelados anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente adicional. El agente adicional puede ser un agente terapéutico para el tratamiento de un trastorno en el cual el DLL4 es dañino. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende un agente adicional seleccionado del grupo que consiste de: un agente terapéutico; un agente de representación gráfica; un agente antineoplásico; un agente quimioterapéutico (tal como un agente alquilante de ADN, cisplatino, carboplatino, un agente anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, una antraciclina, adriamicina, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, irinotecan), e inhibidores del receptor de tirosina quinasa (p.e., erlotinib, gefitinib), un inhibidor de COX-2 (p.e., celecoxib), un inhibidor de quinasa, y un inhibidor de angiogénesis (incluyendo, pero sin limitarse a un anticuerpo anti-VEGF o VEGF-trap); un bloqueador de

molécula de co-estimulación (incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpo anti-B7.1, anticuerpo anti-B7.2, CTLA4-Ig, anticuerpo anti-CD20); un bloqueador de molécula de adhesión (incluyendo pero sin limitarse a un anticuerpo anti-LFA-1, un anticuerpo anti-E/L selectina, y un inhibidor de molécula pequeña); anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo (incluyendo pero sin limitarse a un anticuerpo de anti-IL-18, anti-TNF, y anti-IL-6/receptor de citoquina); metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; un marcador detectable o molécula reportera; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular; un agente antimicrobiano; un agente antisoriático; un corticosteroide; un esteroide anabólico; una eritropoietina, una inmunización, una inmunoglobulina, un agente inmunosupresor; una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un fármaco radiofarmacéutico; un antidepresivo, un fármaco antisicótico, un estimulante, una medicación para el asma; un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

En otro aspecto, la invención provee un método para inhibir la actividad de DLL4 humano que comprende contactar DLL4 humano con una proteína de unión revelada anteriormente, de forma de dicho DLL4 humano es inhibido o neutralizado. En un aspecto relacionado, la invención provee un método para inhibir la actividad de DLL4 en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual DLL4 es dañino, que comprende administrar al sujeto humano una proteína de unión revelada anteriormente, de forma que el DLL4 humano en el sujeto es inhibido y se logra el tratamiento. Preferiblemente, el trastorno se selecciona del grupo que comprende cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de seno, colon, recto, pulmón, orofaríngeo, hipofaríngeo, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesicular y ductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga, y urotelio), tracto

genital femenino (incluyendo cervix, útero, y ovarios así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos, y tumores de célula germinal), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, adrenal, y pituitaria), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo aquellos que aparecen en hueso y tejidos blandos así como sarcoma de Kaposi), tumores de cerebro, nervios, ojos, y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas, y meningiomas), tumores sólidos que aparecen por malignancias hepáticas tales como leucemias y linfomas (linfoma de Hodgkin y diferente de Hodgkin), metástasis de tumor, neovascularización ocular (incluyendo ceguera diabética, retinopatías, degeneración macular inducida por la edad y rubeosis), edema, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, placas ateroscleróticas, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, ascitis refractaria, soriasis, sarcoidosis, arteriosclerosis arterial, sepsis, úlceras pépticas, quemaduras, y pancreatitis, enfermedad de ovario poliquístico (POD), endometriosis, fibroides uterinos, hipertrofia prostática benigna, y otras enfermedades dependientes e independientes de la angiogénesis caracterizadas por la actividad aberrante de DLL4.

En otro aspecto, la invención provee un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno en el cual el DLL4 humano es dañino, que comprende el paso de administrar una cualquiera de las proteínas de unión aquí reveladas anteriormente, concurrentemente, o después de la administración de un segundo agente, como se discutió anteriormente. En una realización preferida, el segundo agente es seleccionado del grupo que consiste de: agente radioterapéutico; un agente antineoplásico; un agente quimioterapéutico (tal como agente alquilante de ADN, cisplatino, carboplatino, un agente anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, una antraciclina, adriamicina, un inhibidor de topoisomerasa I, un

inhibidor de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, irinotecan), un inhibidor de la tirosina quinasa receptora (p.e., erlotinib, gefitinib), un inhibidor de COX-2 (p.e., celecoxib), un inhibidor de quinasa, y un inhibidor de angiogénesis (incluyendo pero sin limitarse a un anticuerpo anti-VEGF o VEGF-trap); un bloqueador de molécula de co-estimulación (incluyendo pero sin limitarse a un anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); un bloqueador de molécula de adhesión (incluyendo pero sin limitarse a un anticuerpo anti-LFA-1, un anticuerpo anti-E/L selectina, un inhibidor de molécula pequeña); un anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos anti-IL-18, anti-TNF, anti-IL-6/receptor de citoquina); metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marcador detectable o reportero; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular; un agente antimicrobiano; un agente antisoriático; un corticosteroide; un esteroide anabólico; una eritropoietina, una inmunización, una inmunoglobulina; un agente inmunosupresor; una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un fármaco radiofarmacéutico; un antidepresivo, un fármaco antisicótico, un estimulante, una medicación para el asma; un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas reveladas anteriormente son administradas al paciente mediante al menos un modo seleccionado del grupo que consiste de: parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitalmente, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal,

intraespinal, intrasínovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Otro aspecto de la invención provee al menos un anticuerpo anti-idiotipo de DLL4 a al menos una proteína de unión a DLL4 de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier proteína o molécula que contiene péptido, que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero sin limitarse a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de marco, y cualquier porción de la misma, que puede ser incorporada en una proteína de unión de la presente invención.

Se puede adaptar cualquiera de una variedad de ensayos de inmunodetección para emplear una proteína de unión a DLL4 de la invención para detectar DLL4 en una mezcla, solución, o muestra biológica. Tales formatos de ensayo de inmunodetección incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunotransferencia (p.e., Western), tiras inmunes (p.e., tiras inmuno reactivas) que comprenden una proteína de unión a DLL4 de la invención adsorbida o inmovilizada al sustrato, FACS, y similares. La detección de DLL4 usando una proteína de unión a DLL4 de la invención puede ser conducida in vitro en una mezcla, solución, o en muestra biológica. Una muestra biológica que puede ser contactada con la proteína de unión de la invención para detectar o medir DLL4 en la muestra incluye, pero no se limita a, orina, saliva, hisopo oral (bucal, lingual, o hisopo de la garganta), hisopo dérmico, raspado dérmico, hisopo rectal, hisopo vaginal, muestra de sangre entera, muestra de plasma, muestra de suero, biopsia de tejido, y cualquier otra muestra obtenida de un individuo mediante un procedimiento conocido en la técnica. En otra realización, una

proteína de unión a DLL4 puede ser empleada para detectar DLL4 *in vivo* tal como varios métodos de tomografía y barrido, incluyendo pero sin limitarse a tomografía asistida por computadora por Rayos X (CT), resonancia magnética (MRI), y tomografía por emisión de positrones (PET).

Descripción Detallada de la Invención

Esta invención se relaciona con proteínas de unión a DLL4, particularmente anticuerpos anti-DLL4, o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen a DLL4. Varios aspectos de la invención se relacionan con anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, y células hospederas para preparar tales anticuerpos y fragmentos. La invención también abarca métodos para usar los anticuerpos de la invención para detectar DLL4 humano o DLL4 murino, métodos para inhibir DLL4 humano o de ratón y/o actividad de VEGFR2 o VEGFR1 humano o de ratón, ya sea *in vitro* o *in vivo*, y los métodos para regular la expresión del gen.

A menos que se defina aquí de otra forma, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. El significado y alcance de los términos debe ser claro, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones aquí proporcionadas tienen precedente sobre cualquier definición del diccionario o extrínseca. Además, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se declare de otra forma. Adicionalmente, el uso del término "que incluye" así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. También, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que

comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se declare específicamente lo contrario.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteína y ácido nucleico aquí descritas son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a lo largo de la presente descripción, a menos que se indique de otra forma. Las técnicas de reacciones enzimáticas y de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las nomenclaturas usadas en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica aquí descritas son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas estándar se usan para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, liberación y tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención pueda ser entendida más fácilmente, los términos seleccionados se definen a continuación.

El término "polipéptido" como se usa aquí, se refiere a cualquier cadena polimérica de amino ácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan intercambiabilmente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de amino ácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. El uso de "polipéptido" aquí pretende abarcar polipéptido y fragmentos y variantes

(incluyendo fragmentos de variantes) de los mismos, a menos que se declare de otra forma. Para un polipéptido antigénico, un fragmento del polipéptido contiene opcionalmente al menos un epítipo contiguo o no lineal de polipéptido. Los límites precisos del al menos un fragmento de epítipo pueden ser confirmados usando habilidad común en la técnica. El fragmento comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos contiguos, tales como al menos aproximadamente 10 amino ácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 amino ácidos contiguos, o al menos aproximadamente 20 amino ácidos contiguos. Un variante de polipéptido es como se describe aquí.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está naturalmente asociado con los componentes que lo acompañan en su estado nativo; es sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; está expresado por una célula de una especie diferente; o no se encuentra en la naturaleza. Así, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina naturalmente, estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína puede también hacerse sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

El término "recuperar" como se usa aquí, se refiere al proceso de hacer una especie química, tal como un polipéptido, sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, p.e., usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

El término "DLL4 humano" (abreviado aquí como "hDLL4" o "huDLL4"), como se usa aquí, incluye varios dominios del tipo EGF y un dominio DSL que

es requerido para la unión al receptor. El término incluye una proteína que comprende aproximadamente 74-75 kDa. La estructura y ADN deducido, y las secuencias de proteína de DLL4 humano se describen mejor en, por ejemplo, Shutter et al., *Genes & Dev.*, 4: 1313-1318 (2000). El término "DLL4 humano" pretende incluir DLL4 humano recombinante (rh DLL4), que puede ser preparado mediante métodos de expresión recombinante estándar.

"Actividad biológica" como se usa aquí con respecto a DLL4, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de DLL4. Las propiedades biológicas de DLL4 incluyen, pero no se limitan a, unión a un receptor Notch, activación de un receptor Notch, regulación negativa de la señalización de VEGF, represión de VEGFR2, e inducción de VEGR1.

Los términos "unión específica" o "específicamente unión", como se usan aquí, con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (p.e., un determinante antigénico o epítipo) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o libre, no marcada A), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación de la misma, que retiene las características de unión a epítipo esenciales de una molécula de Ig. Tales

formatos de anticuerpo mutante, variante, o derivado son conocidos en la técnica. Cuyas realizaciones no limitantes se discuten a continuación.

En un anticuerpo de longitud total, cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden estar adicionalmente divididas en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesto de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas de amino-terminales a carboxi-terminales en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p.e., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clase (p.e., IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

El término "región Fc" se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que puede ser generada mediante digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y comprende opcionalmente un dominio CH4. Los reemplazos de residuos de amino ácido en la porción Fc para alterar la función efectora de anticuerpo son conocidos en la técnica (Patentes Americanas Nos. 5,648,260 y 5,624,821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes p.e., inducción de citoquina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y tasa de

vida media/depuración de anticuerpo y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso nocivas, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos IgG humanos, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC por medio de la unión a FcγRs y complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media circulante de los anticuerpos. En aún otra realización, al menos un residuo de amino ácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de forma que las funciones efectoras del anticuerpo son alteradas. La dimerización de dos cadenas pesadas idénticas de una inmunoglobulina es mediada por la dimerización de dominios CH3 y es estabilizada por los enlaces de disulfuro dentro de la región bisagra (Huber et al., *Nature*, 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*, 293: 67-79 (1999)). La mutación de los residuos de cisteína dentro de la región bisagra para evitar enlaces de disulfuro de cadena pesada-cadena pesada desestabilizará la dimerización de los dominios CH3. Los residuos responsables de la dimerización de CH3 han sido identificados (Dall'Acqua, *Biochem.*, 37: 9266-9273 (1998)). Por lo tanto, es posible generar un Ig medio monovalente. De manera interesante, estas moléculas de Ig medio monovalentes se han encontrado en la naturaleza para las subclases IgG e IgA (Seligman, *Ann. Immunol.*, 129: 855-70 (1978); Biewenga et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 395-400 (1983)). Se ha determinado que la estequiometría de FcRn: región Fc de Ig es 2:1 (West et al., *Biochem.*, 39: 9698-9708 (2000)), y media Fc es suficiente para mediar la unión de FcRn (Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 542-548 (1994)). Las mutaciones para alterar la dimerización del dominio CH3 pueden no tener un efecto adverso mayor en su unión a FcRn porque los residuos importantes para la dimerización de CH3 están localizados en la interfaz interna de la estructura de lámina b de CH3, mientras que la región responsable de la unión a FcRn está localizada en la interfaz exterior de los dominios CH2-CH3. Sin

embargo, la molécula de Ig media puede tener cierta ventaja en la penetración de tejido debido a su menor tamaño que la de un anticuerpo regular. En una realización, al menos un residuo de amino ácido es reemplazado en la región constante de una proteína de unión de la invención, por ejemplo la región Fc, de forma que la dimerización de las cadenas pesadas es alterada, produciendo moléculas de DVD Ig medias. La actividad anti-inflamatoria de IgG es completamente dependiente de la sialilación del glicano enlazado a N del fragmento Fc de IgG. Se han determinado los requerimientos de glicano precisos para la actividad anti-inflamatoria, de forma que se puede crear un fragmento Fc de IgG1 apropiado, generando de esta forma un Fc de IgG1 sialilado totalmente recombinante con potencia mejorada en gran medida (Anthony et al., *Science*, 320: 373-376 (2008)).

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p.e., a un epítipo particular de un antígeno, tal como un epítipo de DLL4). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Tales realizaciones de anticuerpo también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales o multi-específicos; específicamente la unión a dos o más antígenos diferentes (o dos o más epítipos diferentes del mismo antígeno). Ejemplos de los fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature*, 341 :544-546 (1989); Publicación PCT No. WO 90/05144

Al), que comprende un dominio variable sencillo; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, mediante un enlazante sintético que les permite ser preparados como una sola cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, p.e., Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988)). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL están expresados en una cadena de polipéptido sencilla, pero usando un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (ver, p.e., Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)). Tales porciones de unión a anticuerpo son conocidas en la técnica (ver, Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (Springer- Verlag. New York, 2001), p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)). Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla también incluyen "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al. *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995); y Patente Americana No. 5,641,870).

El término "constructo de anticuerpo" (o "constructo de anticuerpo DLL4") como se usa aquí se refiere a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la invención enlazadas a un polipéptido

enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazantes comprenden dos o más residuos de amino ácido unidos por enlaces de péptido y se usan para enlazar una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos enlazantes son ampliamente conocidos en la técnica (ver p.e., Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, RJ., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de amino ácido de dominio constante de cadena pesada y ligera de IgG Humana se conocen en la técnica y se representan en la Tabla 1.

Tabla 1: **Secuencia de dominio constante de cadena pesada y dominio constante de cadena ligera de IgG humana**

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
región constante gamma-1 de Ig	SEQ ID NO:2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
mutante de región constante gamma-1 de Ig	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
región constante Kappa de Ig	SEQ ID NO:4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
región constante Lambda de Ig	SEQ ID NO:5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Aún adicionalmente, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región núcleo de estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6: 93-101 (1995)) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol*, 31: 1047-1058 (1994)). Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros usando técnicas convencionales, tales como digestión en papaína o

pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Más aún, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante estándar, como se describe aquí y se conoce en la técnica.

Un "anticuerpo aislado", como se usa aquí, pretende referirse a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (p.e., un anticuerpo aislado que se une específicamente a hDLL4 es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a hDLL4). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hDLL4 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de DLL4 de otras especies (p.e., muDLL4). Más aún, un anticuerpo aislado puede ser sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos.

El término "anticuerpo monoclonal" y las abreviaturas "MAb" y "mAb", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, p.e., los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se encuentran naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo antígeno. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonales que incluyen típicamente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada mAb está dirigido contra un solo determinante sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variable y constante derivadas de secuencias

de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de amino ácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p.e., mutaciones introducidas aleatoriamente o mutagénesis específica de sitio in vitro o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa aquí, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie mamífera, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera, anticuerpos aislados de una librería de anticuerpo humana combinacional, recombinante (Hoogenboom, *Trends Biotechnol*, 15:62-70 (1997); Azzazy y Highsmith, *Clin. Biochem.*, 35: 425-445 (2002); Gavilondo y Larrick, *BioTechniques*, 29: 128-145 (2000); Hoogenboom y Chames, *Immunol. Today*, 21: 371-378 (2000)), anticuerpos aislados de un animal (p.e., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver, Taylor et al., *Nucl. Acids Res.*, 20: 6287-6295 (1992); Kellermann y Green, *Curr. Opin. Biotechnol*, 13: 593-597 (2002); Little et al., *Immunol. Today*, 21: 364-370 (2000)) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre corte y empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes están sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por ende, las

secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque son derivadas de y relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano in vivo.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie, y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas unidas a regiones constantes humanas.

Como se usa aquí, el término "CDR" se refiere a regiones determinantes de complementariedad dentro de secuencias variables de un anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, las cuales se designan "CDR1", "CDR2" y "CDR3", para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" como se usa aquí, se refiere a un grupo de tres CDRs que se encuentra en una sola región variable que se une al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs han sido definidos de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) provee no solo un sistema de numeración de residuos no ambiguo aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuo precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden ser referidas como "CDRs Kabat". Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDRs Kabat adoptan conformaciones de estructura de péptido casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad a nivel de secuencia de amino ácido. Estas sub-porciones fueron designadas como

"L1", "L2" y "L3" o "H1", "H2" y "H3" donde "L" y "H" designan las regiones de cadena ligera y pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como "CDRs Chothia", que tienen límites que se superponen con las CDRs Kabat. Otros límites que definen CDRs que se superponen con las CDRs Kabat han sido descritos por Padlan, *FASEB J.*, 9: 133-139 (1995) y MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5): 732-745 (1996). Aún otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas presentes, pero sin embargo, se superponen con las CDRs Kabat, aunque pueden ser acortados o alargados en virtud de la predicción o hallazgos experimentales que residuos o grupos de residuos particulares o incluso las CDRs enteras no afectan significativamente la unión a antígeno. Los métodos usados aquí pueden utilizar las CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas realizaciones usan las CDRs definidas por Kabat o Chothia.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kabat" y "marcación Kabat" se usan aquí intercambiamente. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de amino ácido que son más variables (p.e., hipervariables) que otros residuos de amino ácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 190: 382-391 (1971) y Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition. U.S. Department de Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242 (1991)). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de amino ácido 31 a 35 para CDR1, posiciones de amino ácido 50 a 65 para CDR2, y posiciones de amino ácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de amino ácido 24 a 34 para CDR1, posiciones de amino ácido 50 a 56 para CDR2, y posiciones de amino ácido 89 a 97 para CDR3.

El crecimiento y análisis de las bases de datos públicas extensas de secuencias de amino ácido de regiones pesadas y ligeras variables durante los últimos veinte años ha conducido al entendimiento de los límites típicos entre regiones de marco (FR) y secuencias de CDR dentro de secuencias de región variable y permitió a los expertos en este campo determinar las CDRs de acuerdo con la numeración Kabat, numeración Chothia, u otros sistemas. Ver, p.e., Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," In Kontermann y Dübél, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), capítulo 31, páginas 432-433. Un método útil para determinar las secuencias de amino ácido de las CDRs Kabat dentro de las secuencias de amino ácido de las regiones pesada variable (VH) y ligera variable (VL) se provee a continuación:

Para identificar una secuencia de amino ácido de CDR-L1:

Empieza aproximadamente 24 residuos de amino ácido desde el amino terminal en la región VL;

El residuo anterior a la secuencia de CDR-L1 siempre es cisteína (C);

El residuo siguiente a la secuencia de CDR-L1 siempre es el residuo triptófano (W), típicamente Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), pero también Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp- Phe-Gln (W-F-Q), y Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

La longitud es típicamente de 10 a 17 residuos de amino ácido.

Para identificar una secuencia de amino ácido de CDR-L2:

Empieza siempre 16 residuos después del final de CDR-L1;

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-L2 son generalmente Ile-Tyr (I-Y), pero también Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K), e Ile-Phe (I-F);

La longitud es siempre de 7 residuos de amino ácido.

Para identificar una secuencia de amino ácido de CDR-L3:

Empieza siempre 33 amino ácidos después del final de CDR-L2;

El residuo anterior a la secuencia de amino ácido de CDR-L3 es siempre una cisteína (C);

Los residuos siguientes son siempre Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO:374), donde X es cualquier amino ácido;

La longitud es típicamente de 7 a 11 residuos de amino ácido.

Para identificar una secuencia de amino ácido de CDR-H1:

Empieza aproximadamente a 31 residuos de amino ácido desde el terminal amino de la región VH y siempre a 9 residuos después de una cisteína (C);

Los residuos antes son siempre Cys-X-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO:375), donde X es cualquier amino ácido;

El residuo siguiente es siempre un Trp (W), típicamente Trp-Val (W-V), pero también Trp-Ile (W-I), y Trp-Ala (W-A);

La longitud es típicamente de 5 a 7 residuos de amino ácido.

Para identificar una secuencia de amino ácido de CDR-H2:

Empieza siempre 15 residuos de amino ácido después del final de CDR-H1;

Los residuos anteriores son típicamente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 376), pero también otras variaciones;

Los residuos siguientes son Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T7A-T/S/I/A);

La longitud es típicamente de 16 a 19 residuos de amino ácido.

Para identificar una secuencia de amino ácido de CDR-H3:

Empieza siempre a 33 residuos de amino ácido después del final de CDR-H2 y siempre 3 después de una cisteína (C)'

Los residuos anteriores son siempre Cys-X-X (C-X-X), donde X es cualquier amino ácido, típicamente Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Los residuos siguientes son siempre Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO:377), donde X es cualquier amino ácido;

La longitud es típicamente de 3 a 25 residuos de amino ácido.

El término "anticuerpo de CDR injertada" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie, pero en el cual las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL están reemplazadas con secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las cuales una o más de las CDRs murinas (p.e., CDR3) ha sido reemplazada con secuencias de CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (p.e., un ratón) pero en las cuales al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para ser más del "tipo humano", p.e., más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o un variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmuno-específicamente a un antígeno de interés y que comprende una región de marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de amino ácido de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de amino ácido de un anticuerpo no humano. Como se usa aquí, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de amino ácido al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de amino ácido de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en el cual todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de

una inmunoglobulina no humana (p.e., anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones de marco son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. En una realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene solamente una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene solamente una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado contiene solamente un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

Un anticuerpo humanizado puede ser seleccionado de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA, e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar los dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas conocidas en el arte.

Las regiones de marco y CDRs de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias base, p.e., la CDR del el anticuerpo donador o el marco de consenso puede ser mutagenizado mediante sustitución, inserción, y/o delección de al menos un residuo de amino ácido de forma que el residuo de CDR o de marco en ese sitio no corresponde ni con el anticuerpo donador ni con el marco de consenso. En una realización preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán exhaustivas. Usualmente, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos

90%, y lo más preferido al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a aquellos de las secuencias de FR y CDR base. Como se usa aquí, el término "marco de consenso" se refiere a la región de marco en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Como se usa aquí, el término "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los amino ácidos (o nucleótidos) que se encuentran más frecuentemente en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (Ver, p.e., Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). Una "secuencia de inmunoglobulina de consenso" puede, por consiguiente, comprender "región(es) de marco de consenso" y/o "CDR(s) de consenso". En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso es ocupada por el amino ácido que se encuentra más frecuentemente en esa posición en la familia. Si dos amino ácidos se encuentran en la misma frecuencia, cualquiera puede ser incluido en la secuencia de consenso.

Un anticuerpo "madurado de afinidad" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo, que produce un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para un antígeno objetivo, comparado con un anticuerpo base que no posee dicha(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados de afinidad ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Se conocen en la técnica una variedad de procedimientos para producir anticuerpos madurados de afinidad. Por ejemplo, Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992) describe la maduración de afinidad mediante mezclado del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de marco se describe en Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol*, 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol Biol*, 226: 889-896 (1992). La mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectivas y

en contacto o posiciones de hipermutación con una actividad que mejora el residuo de amino ácido se describen en la Patente Americana No. 6,914,128 B1.

El término "proteína de unión multivalente" denota una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno (también referidos aquí como "dominios de unión a antígeno"). Una proteína de unión multivalente está preferiblemente diseñada para tener tres o más sitios de unión a antígeno, y en general no es un anticuerpo que se encuentra naturalmente. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más objetivos relacionados o no relacionados, incluyendo una proteína de unión capaz de unirse a dos o más epítopos diferentes de la misma molécula objetivo.

El término "anticuerpo biespecífico", como se usa aquí, se refiere a anticuerpos de longitud total que son generados mediante tecnología de cuadroma (ver Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (ver, Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)), o mediante botón-en-ojal o enfoques similares que introducen mutaciones en la región Fc (ver Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), produciendo múltiples especies de inmunoglobulina diferentes de las cuales solamente una es el anticuerpo biespecífico funcional. Por función molecular, un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítipo) en uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC), y se une a un antígeno diferente (o epítipo) en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). Por esta definición, un anticuerpo bispecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos (tanto en especificidad como secuencias de CDR), y es monovalente para cada antígeno al cual se une.

El término "anticuerpo específico dual", como se usa aquí, se refiere a anticuerpos de longitud total que se pueden unir a dos antígenos diferentes (o epítopos) en cada uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC) (ver publicación PCT WO 02/02773). En consecuencia, una proteína de unión específica dual tiene dos brazos de unión a antígeno idénticos, con especificidad idéntica y secuencias de CDR idénticas, y es bivalente para cada antígeno al cual se une.

Las proteínas de unión de "dominio variable dual" ("DVD") de la invención comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y pueden ser divalentes (dos sitios de unión a antígeno), tetravalentes (cuatro sitios de unión a antígeno), o proteínas de unión multivalentes. Las DVDs puede ser monoespecíficas, p.e., capaces de unirse a un antígeno (o un epítipo específico), o multiespecíficas, p.e., capaces de unirse a dos o más antígenos (p.e., dos o más epítopos de la misma molécula de antígeno objetivo o dos o más epítopos de diferentes antígenos objetivo). Una proteína de unión de DVD preferida que comprende dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera es referida como una "Inmunoglobulina de DVD" o "DVD-Ig". Tal proteína de unión de DVD-Ig es, por ende, tetramérica y semejante a una molécula de IgG, pero provee más sitios de unión a antígeno que una molécula de IgG. Así, cada mitad de una molécula de DVD-Ig tetramérica es semejante a una mitad de una molécula de IgG y comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada y un polipéptido de DVD de cadena ligera, pero a diferencia de un par de cadenas pesada y ligera de una molécula de IgG que proveen un solo dominio de unión a antígeno, un par de cadenas pesada y ligera de una DVD-Ig proveen dos o más sitios de unión a antígeno.

Cada sitio de unión a antígeno de una proteína de unión de DVD-Ig se deriva de un anticuerpo monoclonal donador ("base") y, por ende, comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena

ligera (VL) con un total de seis CDRs involucradas en la unión por sitio de unión a antígeno. En consecuencia, una proteína de unión de DVD-Ig que se une a dos epítopos diferentes (p.e., dos epítopos diferentes de dos moléculas de antígeno diferentes o dos epítopos diferentes de la misma molécula de antígeno) comprende un sitio de unión a antígeno derivado de un primer anticuerpo monoclonal base y un sitio de unión a antígeno de un segundo anticuerpo monoclonal base.

Se provee una descripción del diseño, expresión y caracterización de moléculas de unión de DVD-Ig en la Publicación PCT No. WO 2007/024715, Patente Americana No. 7,612,181, y Wu et al., *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007). Un ejemplo preferido de tales moléculas de DVD-Ig comprende una cadena pesada que comprende la formula estructural $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, X2 es una región Fc, y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1; y una cadena ligera que comprende la formula estructural $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, en donde VD1 es un primero dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc; y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1. Tal DVD-Ig puede comprender dos de tales cadenas pesadas y dos de tales cadenas ligeras, en donde cada cadena comprende dominios variables enlazados en tándem sin una región constante intercalada entre regiones variables, en donde una cadena pesada y una cadena ligera se asocian para formar sitios de unión a antígeno funcionales en tándem, y un par de cadenas pesada y ligera se pueden asociar con otro par de cadenas pesada y ligera para formar una proteína de unión tetramérica con cuatro sitios de unión a antígeno funcionales. En otro ejemplo, una molécula de DVD-Ig puede comprender cadenas pesada y ligera que comprenden cada una

tres dominios variables (VD1, VD2, VD3) enlazadas en tándem sin una región constante intercalada entre dominios variables, en donde un par de cadenas pesada y ligera se pueden asociar para formar tres sitios de unión a antígeno, y en donde un par de cadenas pesada y ligera se pueden asociar con otro par de cadenas pesada y ligera para formar una proteína de unión tetramérica con seis sitios de unión a antígeno.

En una realización preferida, una proteína de unión de DVD-Ig de acuerdo con la invención se une no solo las mismas moléculas objetivo unidas por sus anticuerpos monoclonales base, sino que también posee una o más propiedades deseadas de uno o más de sus anticuerpos monoclonales base. Preferiblemente, tal propiedad adicional es un parámetro de anticuerpo de uno o más de los anticuerpos monoclonales base. Los parámetros de anticuerpo que pueden ser aportados a una proteína de unión de DVD-Ig de uno o más de sus anticuerpos monoclonales base incluyen, pero no se limitan a, especificidad de antígeno, afinidad de antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítipo, estabilidad de proteína, solubilidad de proteína, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada en tejido, y unión a antígeno ortóloga.

Una proteína de unión de DVD-Ig de acuerdo con la invención se une a al menos un epítipo de una proteína DLL4 humana. Ejemplos no limitantes de una proteína de unión de DVD-Ig de acuerdo con la invención incluyen una proteína de unión de DVD-Ig que se une a uno o más epítopos de DLL4 humano, una proteína de unión de DVD-Ig que se une a un epítipo de un DLL4 humano y un epítipo de un DLL4 de otra especie (por ejemplo, ratón), y una proteína de unión de DVD-Ig que se une a un epítipo de un DLL4 humano y un epítipo de otra molécula objetivo (por ejemplo, VEGFR2 o VEGFR1).

Un "sitio de unión a antígeno funcional" de una proteína de unión es uno que es capaz de unirse a un antígeno objetivo. La afinidad de unión a antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo base del cual se deriva el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unirse al antígeno debe ser medible usando uno cualquiera de una variedad de métodos conocidos para evaluar la unión de anticuerpo a un antígeno. Más aún, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente presente no necesita ser cuantitativamente iguales.

Como se usa aquí, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptador" se refieren a un anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que provee o codifica para al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de amino ácido de una o más de las regiones de marco FR. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere al amino ácido o secuencia de ácido nucleico de anticuerpo que provee o codifica para la(s) región(es) constante(s). En aún otra realización, el término "aceptor" se refiere al amino ácido o secuencia de ácido nucleico de anticuerpo que provee o codifica para una o más de las regiones de marco y la(s) región(s) constante(s). En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a un amino ácido o secuencia de ácido nucleico de anticuerpo humano que provee o codifica para al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de amino ácido de una o más de las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un aceptador puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de amino ácido que no se encuentran en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco aceptora y/o región(es) constante(s) aceptador(as) pueden ser, p.e., derivadas u obtenidas de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo

maduro, un anticuerpo funcional (p.e., anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se usa aquí, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica particular definida por Chothia et al. (*J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817 (1992), ambas aquí incorporadas mediante referencia). De acuerdo con Chothia et al., las porciones críticas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen conformaciones de estructura de péptido casi idénticas a pesar de la gran diversidad a nivel de secuencia de amino ácido. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la estructura de péptido para un segmento contiguo de residuos de amino ácido que forman un asa.

Como se usa aquí, los términos "donador" y "anticuerpo donador" se refieren a un anticuerpo que provee una o más CDRs. En una realización, el anticuerpo donador es un anticuerpo de una especie diferente a la del anticuerpo del cual se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo no humano que provee una o más CDRs.

Como se usa aquí, el término "marco" o "secuencia de marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede ser determinada mediante diferentes sistemas (por ejemplo, ver anteriormente), el significado de una secuencia de marco está sometido a las diferentes interpretaciones correspondientes. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) también se dividen en las regiones de marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) sobre cada cadena, en las cuales CDR1 está posicionada entre FR1 y

FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, referida por otras, representa las FR's combinadas dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina sencilla que se encuentra naturalmente. Como se usa aquí, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FRs representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

Las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humanas son conocidas en la técnica. En una realización de la invención, las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera son seleccionadas de las secuencias descritas en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2. Secuencias Aceptoras de Cadena Pesada

SEQ ID NO.:	Región de Proteína/ Familia de línea germinal más cercana	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
6	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLLTCTFSGFSLS
7	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
8	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
9	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
10	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLLTCTVSGFSLS
7	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
11	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR
9	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
12	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
13	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
14	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
9	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
15	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
9	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
18	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS
19	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
20	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
9	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO.:	Región de Proteína/ Familia de línea germinal más cercana	Secuencia
21	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
19	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGGGLEWVG
22	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
35	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS
36	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
37	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
38	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTTLTVSS
39	IGHV3-66 FW1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
40	IGHV3-66 FW2	WIRQAPGKGLEWIG
41	IGHV3-66 FW3	RVTISVDTSKNSFYLMNSLRAEDTAVYYCAR
42	IGHV3-66/JH FW4	WGQGTTLTVSS
43	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
44	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
45	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSSVRAEDTAVYYCAR
46	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTTLTVSS
47	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
48	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
49	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKASDTAMYCAR
50	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
51	IGHV2-70 FR1	EVTLRSGPALVKPTQTTLTLCTVSGGSIS
52	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
53	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDATYYCAR
54	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTTVTVSS
55	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
56	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
57	IGHV3-15 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
58	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
59	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
60	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
61	IGHV3-43 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
62	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMTVTVSS

Tabla 3. Secuencias Aceptoras de Cadena Ligera

SEQ ID NO.:	Región de Proteína/ Familia de línea germinal más cercana	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
23	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
24	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
25	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
26	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
27	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
28	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
29	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
26	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
30	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC

SEQ ID NO.:	Región de Proteína/ Familia de línea germinal más cercana	Secuencia
31	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
32	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
26	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
33	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC
34	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
32	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
26	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
63	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
64	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
65	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
66	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
67	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
68	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
69	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
70	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
71	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVSPGQTASITC
72	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
73	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
74	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
75	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC
76	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
77	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC
78	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
79	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
80	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVII
81	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYC
82	IGKV6D-21/JK FR4	FGQGTKVEIKR
83	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
84	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
85	IGKV3D-15 FR3	DIPARFSGSNSGDEATLTISLQSEDAVYYC
86	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
87	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
88	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVII
89	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDATLTISLQAEDVAVYYC
90	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
91	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASITC
92	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
93	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
94	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
95	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
96	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
97	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
98	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

Como se usa aquí, el término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sido sometidas al proceso de maduración que conduce al rearreglo genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Ver, p.e., Shapiro et al., *Crit. Rev. Immunol*, 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., *Adv. Exp. Med. Biol*, 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por varias realizaciones de la presente invención provienen del reconocimiento que los genes de anticuerpo de línea germinal son más probables que los genes de anticuerpo maduros en conservar las estructuras de secuencia de amino ácido esenciales características de individuos en las especies, por ende, menos probables a ser reconocidas como de una fuente foránea cuando se usan terapéuticamente en esas especies.

Como se usa aquí, el término "residuo clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen más impacto en la especificidad de unión y/o afinidad de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: un residuo que está adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de glicosilación N- u O-), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera, un residuo dentro de una zona Vernier, y un residuo en la región que se superpone entre la definición Chothia de una CDR1 de cadena pesada variable y la definición Kabat de el primer marco de cadena pesada.

Como se usa aquí, zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos de marco que pueden ajustar a la estructura de CDR y que pueden ajustar a la estructura de CDR y mejorar la adaptación al antígeno como lo

describe Foote y Winter (*J. Mol Biol*, 224: 487-499 (1992)). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que subyace las CDRs y pueden impactar en la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

Como se usa aquí, el término "neutralizar" se refiere a contrarrestar la actividad biológica de un antígeno cuando una proteína de unión se une específicamente al antígeno. En una realización, la proteína de unión neutralizante se une a un antígeno, reduce su actividad biológicamente en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, o más.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hDLL4 que se une a un antígeno de DLL4 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, o un anticuerpo anti-hDLL4 cuya unión a hDLL4 inhibe la actividad biológica de hDLL4, p.e., inhibición de la unión a receptor en un ensayo de unión ligando-receptor o inhibición de la actividad del receptor en un ensayo de reportero Notch humano, o estimulación de la proliferación celular endotelial en un ensayo de germinación.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como amino ácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Un epítipo consiste entonces de los residuos de amino ácido de una región de un antígeno (o fragmento del mismo) conocidos por unirse al sitio de complementariedad en el compañero de unión específica. Un antígeno o fragmento antigénico puede contener más de un

epítopo. Así, los expertos en esta técnica entienden que cada "sitio de unión a antígeno" de una molécula de anticuerpo se une a un epítopo de una molécula de antígeno, y cada molécula de antígeno puede tener uno, dos, varios o muchos epítopos. Más aún, los expertos en esta técnica entienden que dos anticuerpos aislados independientemente a una molécula de antígeno se pueden unir al mismo epítopo o a dos epítopos diferentes en la molécula de antígeno.

En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente cuando reconoce su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dicen que los anticuerpos se "unen al mismo epítopo" si los anticuerpos compiten cruzadamente (uno evita la unión o modula el efecto del otro). Adicionalmente, las definiciones estructurales de epítopos (de superposición, similar, idéntico) son informativas, pero las definiciones funcionales son a menudo más relevantes porque abarcan parámetros estructurales (de unión) y funcionales (modulación, competencia).

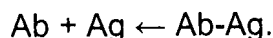
El término "resonancia de plasmón superficial" como se usa aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones de concentraciones de proteína dentro de la matriz biosensora, usando por ejemplo el sistema BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Suecia y Piscataway, New Jersey, US). Para descripciones adicionales, ver Jönsson et al., *Ann. Biol. Clin.*, 51: 19-26 (1993); Jönsson et al. *BioTechniques*, 11: 620-627 (1991); Johnsson et al., *J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131 (1995); y Johnsson et al., *Anal. Biochem.*, 198: 268-277 (1991).

El término " K_{on} ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación para asociación de una proteína de unión (p.e., un anticuerpo) a un compañero afín (p.e., un antígeno) para formar un complejo

compañero de unión/compañero afín (p.e., anticuerpo/antígeno) como se conoce en la técnica. La " K_{on} " también es conocida por los términos "constante de velocidad de asociación" o " k_a " como se usa aquí intercambiamente. Este valor que indica la velocidad de unión de un anticuerpo a su antígeno objetivo o la velocidad de formación del complejo entre un anticuerpo y antígeno también se muestra mediante la ecuación:



El término " K_{off} " como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de una proteína de unión (p.e., un anticuerpo) del, p.e., complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica. La " K_{off} " también es conocida por los términos "constante de velocidad de disociación" o " k_d " como se usa aquí intercambiamente. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno objetivo o separación del complejo Ab-Ag en el tiempo al anticuerpo y antígeno libre como se muestra en la siguiente ecuación:



Los términos "constantes de disociación en equilibrio" o " K_D ", como se usan aquí intercambiamente, se refieren al valor obtenido en una medida de titulación en equilibrio, o dividiendo la constante de velocidad de disociación (K_{off}) por la constante de velocidad de asociación (K_{on}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación, y la constante de disociación en equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en amortiguadores fisiológicos en

equilibrio. Se pueden usar otros enfoques e instrumentos tales como una ensayo de resonancia de plasmón superficial con BIAcore® (análisis de interacción biomolecular) (p.e., instrumento disponible en BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, se puede usar también un ensayo KinExA® (Ensayo de Exclusión Cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

"Marcador" y "marcador detectable" significan una mitad unida a un compañero de unión específica, tal como un anticuerpo o un analito unido por el anticuerpo, p.e., para hacer detectable la reacción entre miembros de un par de unión específico, tal como un anticuerpo y un analito. El compañero de unión específica, p.e., anticuerpo o analito, así marcado es referido como "marcado detectablemente". Así, el término "proteína de unión marcada" como se usa aquí, se refiere a una proteína con una etiqueta incorporada que provee la identificación de la proteína de unión. En una realización, el marcador es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, p.e., incorporación de un amino ácido radiomarcado o unión a un polipéptido de mitades biotiniladas que pueden ser detectadas por una avidina marcada (p.e., una avidina o una estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). Ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p.e., ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm); cromógenos, marcadores fluorescentes (p.e., FITC, rodamina, y fósforos lantánido), etiquetas enzimáticas (p.e., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminescentes; grupos biotinilados; epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportero secundario (p.e., secuencias de par cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal y etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. Ejemplos

representativos de marcadores empleados comúnmente en inmunoensayos incluyen mitades que producen luz, p.e., compuestos de acridinio, y mitades que producen fluoresceína, p.e., fluoresceína. Se conocen o se describen aquí otros marcadores. En este aspecto, la mitad en sí puede no estar marcada detectablemente, pero puede volverse detectable a la reacción con ya otra molécula. El uso "marcado detectablemente" pretende abarcar el último tipo de marcado detectable.

El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, enlazado químicamente a una segunda mitad química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se usa aquí para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos. Preferiblemente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina de pertusis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los términos "cristal" y "cristalizado" como se usan aquí, se refieren a una proteína de unión (p.e., un anticuerpo), o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos de arreglos regulares, en repetición, tridimensionales de átomos, iones, moléculas (p.e., proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (p.e., complejos antígeno/anticuerpo). Estos arreglos tridimensionales están dispuestos de acuerdo con relaciones matemáticas

específicas que son bien entendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción que se repite en un cristal se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en un arreglo que se conforma en una simetría cristalográfica bien definida dada, provee la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria por traducciones regulares en todas las tres dimensiones proporciona el cristal. Ver, Giege et al., en Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach. 2a ed. (Ducruix y Giege, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999), capítulo 1, páginas 1-16.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN mono y dicatenarias.

El término "polinucleótido aislado", como se usa aquí significará un polinucleótido (p.e., de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con toda o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está operablemente unido a un polinucleótido al que no está enlazado en la naturaleza; o no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "vector", como se usa aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha estado enlazada. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una asa de ADN dicatenario circular en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ser ligados en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la cual son introducidos (p.e.,

vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores mamíferos episomales). Otros vectores (p.e., vectores mamíferos no episomales) pueden estar integrados en el genoma de una célula hospedera a la introducción en la célula hospedera, y de esta forma son replicados junto con el genoma hospedero. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente enlazados. Tales vectores son referidos aquí como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiamente porque el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p.e., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno asociados), que sirven funciones equivalentes. Las versiones de ARN de vectores (incluyendo vectores virales de ARN) también pueden encontrar uso en la invención.

El término "enlazado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera dispuesta. Una secuencia de control "enlazada operablemente" a una secuencia de codificación está ligada de forma que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "enlazadas operablemente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que están contiguas con el gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan *en trans*, p.e., localizadas en una molécula de ácido nucleico diferente a la de un gen de interés, así como secuencias de control de expresión que están localizadas en la misma molécula de ácido nucleico como, pero a una distancia de un gen de interés. El término "secuencia de control de expresión" como se usa aquí se refiere a secuencias de polinucleótido que son necesarias para

efectuar la expresión y procesamiento de las secuencias de codificación a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen iniciación, terminación de transcripción apropiadas, secuencias promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (p.e., secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedero; en procariotes, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosómico, y una secuencia de terminación de transcripción; en eucariotes, generalmente tales secuencias de control incluyen un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañero de fusión.

"Transformación" se refiere a cualquier proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno (p.e., una molécula de ADN) entra a una célula hospedera. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. La transformación se puede basar en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneas en una célula hospedera procariótica o eucariótica. El método se selecciona con base en la célula hospedera que está siendo transformada y puede incluir, pero no se limita a, captación de plásmido a través de una membrana celular, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partícula. Tales células "transformadas" incluyen células establemente transformadas en las cuales el ADN insertado es capaz de replicación ya sea como un plásmido de replicación autónomo o como parte del

cromosoma hospedero. También incluyen células que se expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera"), pretende referirse a una célula en la cual el ADN exógeno ha sido introducido. En una realización, la célula hospedera comprende dos o más (p.e., múltiples) ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos, tales como, a manera de ejemplo no limitante, las células hospederas descritas en la Patente US No. 7,262,028. Tales términos pretenden referirse no solamente a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones posteriores debido a cualquier mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula base, pero está aún incluida en el alcance del término "célula hospedera" como se usa aquí. En una realización, las células hospederas incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas de cualquiera de los Reinos de la vida. En otra realización, las células eucarióticas incluyen células de protisto, fúngicas, de planta y animal. En otra realización, las células hospederas incluyen, pero no se limitan a especies procarióticas, tales como *Escherichia coli*; líneas celulares mamíferas, tales como CHO, HEK 293, COS, NSO, SP2, y PER.C6; la línea celular de insecto Sf9; y especies de células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo y transformación de tejido (p.e., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica, o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden ser generalmente realizados de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas citadas y discutidas a lo largo

de la presente descripción. Ver, p.e., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

"Organismo transgénico", como se conoce en la técnica, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no está naturalmente expresado en el organismo. Un "transgén" es un constructo de ADN, que está establemente y operablemente integrado en el genoma de una célula de la cual se desarrolla el organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto de gen codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

El término "regular" y "modular" se usa intercambiamente, y, como se usan aquí, se refieren a un cambio o una alteración de la actividad de una molécula de interés (p.e., la actividad biológica de hDLL4). La modulación puede ser un aumento o un descenso de la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular, y transducción de señal.

Correspondientemente, el término "modulador" como se usa aquí, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (p.e., la actividad biológica de hDLL4). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o descenso de la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o

moléculas orgánicas pequeñas. Los Peptidocuerpos han sido descritos. Ver, p.e., Publicación PCT No. WO01/83525.

El término "agonista", como se usa aquí, se refiere a un modulador que, cuando es contactado con una molécula de interés, causa un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula, comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del agonista. Agonistas de interés particulares pueden incluir, pero no se limitan a, miembros de la ruta de señalización Notch, polipéptidos y ácidos nucleicos del DLL4, carbohidratos, o cualquier otra molécula que se une a DLL4.

El término "antagonista" o "inhibidor", como se usa aquí, se refiere a un modulador que, cuando se contacta con una molécula de interés, causa una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del antagonista. Antagonistas particulares de interés incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de DLL4, especialmente DLL4 humano (hDLL4). Los antagonistas e inhibidores de hDLL4 pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula, que se une a hDLL4 y/o DLL4 de roedor.

Como se usa aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo; inhibe o evitar el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno; inhibe o evitar la recurrencia, desarrollo, aparición o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia (p.e., agente profiláctico o terapéutico).

"Paciente" y "sujeto" se pueden usar aquí intercambiablemente para referirse a un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (por ejemplo, un humano, un mono, y un chimpancé), un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata, un ratón o una ballena), un pájaro (p.e., un pato o un ganso), y un tiburón. Preferiblemente, un paciente o sujeto es un humano, tal como un humano que está siendo tratado o evaluado para una enfermedad, trastorno o condición; un humano en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición; un humano que tiene una enfermedad, trastorno o condición; y/o humano que está siendo tratado para una enfermedad, trastorno o condición. Más preferiblemente, un paciente o sujeto está siendo tratado o evaluado para cáncer u otra enfermedad en la cual la expresión aberrante de DLL4 existente soporta el cáncer u otra enfermedad y la inhibición o alteración de la actividad de DLL4 es deseable para tratar el cáncer u otra enfermedad.

El término como se usa aquí, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se usa aquí, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de una cosa viviente o inicialmente cosa viviente. Tales cosas vivientes incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, micos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, (p.e., sangre entera), plasma, suero, orina, fluido amniótico, fluido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula espinal, ganglios linfáticos y bazo.

"Componente", "componentes" y "al menos un componente", se refiere a un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección o conjugado, un control, un calibrador, una serie de calibradores, un panel de sensibilidad, un recipiente, un amortiguador, un diluyente, una sal, una enzima, un co-factor para una

enzima, un reactivo de detección, un reactivo/solución de pretratamiento, un sustrato (p.e., como una solución), una solución de detención, y similares, que se pueden incluir en un kit de ensayo de una muestra de prueba, tal como orina, suero o muestra de plasma de un paciente, de acuerdo con los métodos aquí descritos y otros métodos conocidos en la técnica. Así, en el contexto de la presente revelación, "al menos un componente", "componente" y "componentes" pueden incluir un polipéptido u otro analito anterior, tal como una composición que comprende un analito tal como un polipéptido, que está opcionalmente inmovilizado en un soporte sólido, tal como mediante unión a un anticuerpo anti-analito (p.e., anti-polipéptido). Algunos componentes pueden estar en solución o liofilizados para reconstitución para uso en un ensayo.

"Riesgo" se refiere a la posibilidad o probabilidad que ocurra un evento particular ya sea al presente o en algún punto en el futuro. "Estratificación del riesgo" se refiere a un arreglo de factores de riesgo clínico conocido que permite a los médicos clasificar a los pacientes en un riesgo bajo, moderado, alto o el más alto de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición particular.

"Específica" y "especificidad" en el contexto de una interacción entre miembros de un par de unión específico (p.e., un antígeno o fragmento del mismo y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) se refiere a la reactividad selectiva de la interacción. La frase "se une específicamente a" y frases análogas se refieren a la capacidad de los anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de unirse específicamente a una molécula de interés (o un fragmento de la misma) y no unirse específicamente a otras entidades.

"Compañero de unión específica" es un miembro de un par de unión específica. Un par de unión específica comprende dos moléculas diferentes,

que se unen específicamente entre sí por medios químicos o físicos. Por lo tanto, además de los pares de unión específica antígeno y anticuerpo, otros pares de unión específica pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótido complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores de enzimas y enzimas, y similares. Adicionalmente, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de unión específica originales, por ejemplo, un analito-análogo. Los miembros de unión específica inmunorreactiva incluyen antígenos, fragmentos de antígeno, y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales así como complejos, fragmentos, y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de los mismos, ya sea aislados o producidos recombinantemente.

"Variante" como se usa aquí significa un polipéptido que difiere de un polipéptido dado (p.e., polipéptido de DLL4 o anticuerpo anti-DLL4) en la secuencia de amino ácido por la adición (p.e., inserción), delección, o sustitución conservativa de amino ácidos, pero retiene la actividad biológica del polipéptido dado (p.e., un DLL4 variante puede competir con un DLL4 tipo salvaje para la unión con un anticuerpo anti-DLL4 si el DLL4 variante retiene el sitio de unión del anticuerpo (epítipo) de DLL4 de tipo salvaje original. Una sustitución conservativa de un amino ácido, p.e., el reemplazo de un amino ácido con un amino ácido diferente de propiedades similares (p.e., hidrofiliicidad y grado y distribución de regiones cargadas) es reconocido en la técnica como que involucra típicamente un cambio menor. Estos cambios menores pueden ser identificados, en parte, considerando el índice hidropático de los amino ácidos, como se entiende en la técnica (ver, p.e., Kyte et al., *J. Mol. Biol*, 157: 105-132 (1982)). El índice hidropático de un amino ácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Se conoce en la técnica que los amino ácidos de índices hidropáticos similares pueden ser sustituidos y aún retienen la función de proteína. En un aspecto, se sustituyen los amino ácidos que tienen índices

de ± 2 . La hidrofiliidad de los amino ácidos también se puede usar para revelar sustituciones que producirían proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofiliidad de los amino ácidos en el contexto de un péptido, permite el cálculo de la hidrofiliidad promedio local más grande de ese péptido, una medida útil que se ha reportado que se correlaciona bien con la antigenicidad e inmunogenicidad (ver, p.e., Patente Americana No. 4,554,101). La sustitución de amino ácidos que tienen valores de hidrofiliidad similares puede producir péptidos que retienen la actividad biológica, por ejemplo inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. En un aspecto, las sustituciones se realizan con amino ácidos que tienen valores de hidrofiliidad de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de los amino ácidos está influenciado por la cadena lateral particular de ese amino ácido. Consistente con esa observación, se entiende que las sustituciones de amino ácido que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los amino ácidos, y particularmente las cadenas laterales de aquellos amino ácidos, como lo revela la hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y otras propiedades. "Variante" también se puede usar para describir un polipéptido o fragmento del mismo que ha sido procesado diferencialmente, tal como mediante proteólisis, fosforilación, u otra modificación post-traducciona, aún retiene su actividad biológica o reactividad de antígeno, p.e., la capacidad para unirse a DLL4. El uso de "variante" aquí pretende abarcar fragmentos de un variante a menos que el contexto lo contradiga.

El término "muestra", como se usa aquí, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se usa aquí, incluye, pero no se limita a cualquier cantidad de una sustancia de una cosa viviente, o inicialmente cosa viviente. Tales cosas vivientes incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias

incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula espinal, ganglios linfáticos, y bazo.

I. Anticuerpos que se Unen a DLL4 Humano.

Un aspecto de la presente invención provee anticuerpos monoclonales murinos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a DLL4 con alta afinidad, una velocidad de disociación lenta, y/o alta capacidad neutralizante. Convenientemente, tales anticuerpos humanos o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen a DLL4 encuentran uso como agentes terapéuticos humanos que pueden ser administrados a un paciente humano con respuesta mínima o sin respuesta por el sistema inmune del paciente hacia la proteína terapéutica de unión a DLL4. En consecuencia, un paciente puede obtener beneficio de tales proteínas de unión a DLL4 totalmente humanas durante el curso de administraciones repetidas. Otros aspectos de la invención proveen anticuerpos quiméricos que se unen a DLL4 y anticuerpos de CDR injertada, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a DLL4. Preferiblemente, los anticuerpos, o porciones de los mismos, son anticuerpos asilados. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos anti-DLL4 humanos neutralizantes.

A. Método para preparar anticuerpos anti DLL4.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier número de técnicas conocidas en el arte. Un método preferido es la tecnología de despliegue de ARNm PROfusion ejemplificada en el Ejemplo 2 presente. Otro método es inmunizar un roedor transgénico (p.e., un ratón transgénico) que porta un complemento funcional de genes de inmunoglobulina humana con DLL4 humano o porción antigénica del mismo, seguida por tecnología de hibridoma estándar que genera hibridomas que expresan

anticuerpos monoclonales totalmente humanos que se unen a DLL4 humano. Los anticuerpos humanos recombinantes mediante dicho método tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales métodos proveen proteínas de unión a DLL4 totalmente humanas y eliminan la necesidad de realizar de otra forma, una o más rondas de humanización para reducir las fuentes de antigenicidad no humana en las moléculas de anticuerpo DLL4 monoclonal. En consecuencia, las técnicas que utilizan material de especies múltiples son menos preferidas pero se pueden usar.

También se nota que el término "anticuerpo monoclonal" como se usa aquí, no está limitado a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico, o de fago, y no del método mediante el cual se produce.

Aspectos adicionales de varias técnicas que se pueden emplear para obtener moléculas de anticuerpo monoclonal a DLL4 de acuerdo con la invención se describen a continuación.

1. Anticuerpos monoclonales anti-DLL4 usando tecnología de hibridoma.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante, y despliegue del fago, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se puede producir usando técnicas de hibridoma conocidas en la técnica, y enseñadas, por ejemplo en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, segunda edición, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., En Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, páginas 563-681 (Elsevier, New

York, 1981) (dichas referencias incorporadas por referencia en su totalidad). Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son de rutina y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente invención provee métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos mediante el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde el hibridoma, es preferiblemente generado fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención, con células de mieloma y luego seleccionar los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, los ratones pueden ser inmunizados con un antígeno de DLL4. En una realización preferida, el antígeno de DLL4 es administrado con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores). Tales adyuvantes pueden proteger el polipéptido de la rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el hospedero para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si un polipéptido está siendo administrado, el esquema de inmunización involucrará dos o más administraciones del polipéptido, extendidas en varias semanas; sin embargo, también se puede usar una sola administración del polipéptido.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno DLL4, los anticuerpos y/o células que producen anticuerpo pueden ser obtenidos del animal. Se obtiene un suero que contiene anticuerpo anti-DLL4 del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede usar como se obtiene del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener del suero, o los anticuerpos anti-DLL4 pueden ser purificados del suero. El suero o las

inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, teniendo por ende, un arreglo de propiedades heterogéneo.

Una vez se detecta una respuesta inmune, p.e., anticuerpos específicos para el antígeno DLL4 son detectados en el suero de ratón, el bazo del ratón es recolectado y los esplenocitos aislados. Los esplenocitos son entonces fusionados mediante técnicas bien conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, Virginia, US). Los hibridomas son seleccionados y clonados mediante dilución limitada. Los clones de hidridoma son entonces ensayados mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a DLL4. Se puede generar fluido ascitis, que contiene generalmente altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpo se pueden preparar del animal inmunizado. Después de inmunización, el animal es sacrificado y las células B esplénicas son fusionadas a células de mieloma inmortalizadas como se conoce bien en la técnica. Ver, p.e., Harlow y Lane, supra. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de fusión y selección antibiótica, los hibridomas son seleccionados usando DLL4, o una porción del mismo, o una célula que expresa DLL4. En una realización preferida, la selección inicial se realiza usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de selección de ELISA se provee en la Publicación PCT No. WO 00/37504, aquí incorporada mediante referencia.

Se seleccionan, clonan y seleccionan adicionalmente hibridomas que producen anticuerpo anti-DLL4 para características deseables, incluyendo

crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseables, como se discute mejor más adelante. Los hibridomas pueden ser cultivados y expandidos *in vivo* en animales singenéticos, en animales que carecen de un sistema inmune, p.e., ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describieron anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas son producidos en una especie no humana, no ratón, tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. En aún otra realización preferida, los hibridomas son hibridomas humanos en los cuales un mieloma no secretor humano está fusionado con una célula que expresa un anticuerpo anti-DLL4.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos se puede generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención pueden ser producidos mediante clivado proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera, y el dominio CH1 de la cadena pesada.

2. Anticuerpos anti-DLL4 monoclonales usando SLAM.

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos simples aislados usando un procedimiento referido en la técnica como el método de anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM), como se describe en la Patente Americana No. 5,627,052; Publicación PCT No. WO 92/02551; y Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7843-7848 (1996).

En este método se seleccionan células simples que secretan los anticuerpos de interés, p.e., linfocitos derivados de cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección I.A.1 (anterior), usando un ensayo de placa hemolítica específica de antígeno, en donde el antígeno DLL4, una subunidad de DLL4, o un fragmento del mismo, está acoplado a glóbulos rojos de oveja usando un enlazante, tal como biotina, y se usa para identificar células que secretan anticuerpos con especificidad para DLL4. Después de la identificación de las células de interés que secretan anticuerpo, los ADNc de región variable de cadena pesada y ligera son rescatados de las células mediante PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR) y estas regiones variables pueden entonces ser expresadas, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (p.e., regiones constantes humanas), en células hospederas mamíferas, tales como células COS o CHO. Las células hospederas transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden entonces someterse a análisis y selección adicionales *in vitro*, por ejemplo mediante filtrando las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos a DLL4. Las secuencias de inmunoglobulina identificadas amplificadas pueden ser además manipuladas *in vitro*, tal como mediante método de maduración de afinidad *in vitro*. Ver, por ejemplo, Publicación PCT No. WO 97/29131 y Publicación PCT No. WO 00/56772.

3. Anticuerpos anti-DLL4 monoclonales usando animales transgénicos.

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos son producidos inmunizando un animal no humano que comprende algunos, o todos los puntos de inmunoglobulina humana con un antígeno de DLL4. En una realización preferida, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón diseñada que comprende fragmentos grandes de los puntos de inmunoglobulina humana y es deficiente en

producción de anticuerpo de ratón. Ver, p.e., Green et al., *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994) y Patentes Americanas Nos 5,916,771; 5,939,598; 5,985,615; 5,998,209; 6,075,181; 6,091,001; 6,114,598; y 6,130,364. Ver También Publicaciones PCT Nos. WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; y WO 00/37504. El ratón transgénico XENOMOUSE® produce un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos, y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE® contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal de tamaño de megabase de los puntos de cadena pesada humana y x puntos de cadena ligera. Ver Mendez et al., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998), cuyas revelaciones están aquí incorporadas mediante referencia.

4. Anticuerpos anti-DLL4 monoclonales usando librerías de anticuerpo recombinantes.

Los métodos *in vitro* también se pueden usar para preparar los anticuerpos de la invención, en donde una librería de anticuerpo es seleccionada para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión a DLL4 deseada. Los métodos para tal selección de librerías de anticuerpo recombinante son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Patente Americana No. 5,223,409 (Ladner et al.); Publicación PCT No. WO 92/18619 (Kang et al.); Publicación PCT No. WO 91/17271 (Dower et al.); Publicación PCT No. WO 92/20791 (Winter et al.); Publicación PCT No. WO 92/15679 (Markland et al.); Publicación PCT No. WO 93/01288 (Breitling et al.); Publicación PCT No. WO 92/01047 (McCafferty et al.); Publicación PCT No. WO 92/09690 (Garrard et al.); Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:

81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); Publicación de Solicitud de Patente Americana No. 2003/0186374; y Publicación PCT No. WO 97/29131, cuyos contenidos de cada una están incorporados aquí mediante referencia.

La librería de anticuerpo recombinante puede ser de un sujeto inmunizado con DLL4, o una porción de DLL4. Alternativamente, la librería de anticuerpo recombinante puede ser de un sujeto inocuo, p.e., uno que no ha sido inmunizado con DLL4, tal como una librería de anticuerpo humana de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con DLL4 humana. Los anticuerpos de la invención son elegidos mediante selección de la librería de anticuerpo recombinante con el péptido que comprende DLL4 humano para así seleccionar aquellos anticuerpos que reconocen DLL4. Los métodos para conducir tal elección y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión particulares para DLL4, tales como aquellas de disociarse de DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} particular, se puede usar el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de velocidad k_{off} deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante para hDLL4 particular, tal como aquella con un IC_{50} particular, se pueden usar métodos estándar conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de DLL4.

En un aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a DLL4 humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En varias realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal..

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden ser generados usando varios métodos de despliegue del fago conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue del fago, los dominios del anticuerpo funcionales son mostrados sobre la superficie de partículas de fago las cuales portan las secuencias de polinucleótido que los codifican. Tal fago puede ser utilizado para mostrar los dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o librería de anticuerpo combinacional (p.e., humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con antígeno, p.e., usando antígeno marcado o antígeno enlazado o capturado en una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos es típicamente fago filamentoso que incluye los dominios de unión fd y M13 expresados del fago con dominios de anticuerpo Fv estabilizado con Fab, Fv o disulfuro fusionados recombinantemente a cualquiera del gen II del fago o proteína del gen VIII. Ejemplos de métodos de despliegue del fago que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados en Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol*, 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene*, 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994); Publicación PCT No. WO 92/01047; Publicaciones PCT Nos. WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes Americanas Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225;

5,658,727; 5,733,743; y 5,969,108; cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones que codifican el anticuerpo en el fago pueden ser asiladas y usadas para generar anticuerpos enteros que incluyen anticuerpos humanos y cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresados en cualquier hospedero deseado, incluyendo células mamíferas, células de insecto, células de planta, levadura, y bacterias, p.e., descritas en detalle más adelante. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden ser empleadas usando métodos conocidos en la técnica, tales como los revelados en la publicación PCT No. WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6): 864-869 (1992); Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol*, 34: 26-34 (1995); y Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988) (dichas referencias incorporadas mediante referencia en su totalidad). Ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fvs de cadena sencilla y anticuerpos incluyen aquellos descritos en las Patentes Americanas No. 4,946,778 y 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science*, 240: 1038-1041 (1988).

Alternativo a la selección de librerías de anticuerpo recombinantes mediante despliegue del fago, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para seleccionar grandes librerías combinacionales para la identificación de anticuerpos de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el cual la librería de anticuerpo recombinante es expresada como fusiones ARN-proteína, descritas en la Publicación PCT No. WO 98/31700 (Szostak y Roberts), y en Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12297-12302 (1997). En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína que lo codifica por traducción

in vitro de ARNm sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor peptídico, en su extremo 3'. Así, un ARNm específico puede ser enriquecido de una mezcla compleja de ARNm (p.e., una librería combinatorial) con base en las propiedades del péptido o proteína codificada, p.e., anticuerpo, o porción del mismo, tal como unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas de la selección de tales librerías pueden ser expresadas por medios recombinantes aquí descritos (p.e., en células hospederas mamíferas) y, más aún, pueden ser sometidas a maduración de afinidad adicional mediante rondas adicionales de selección de fusiones de ARNm-péptido en las cuales se han introducido mutaciones en la(s) secuencia(s) originalmente seleccionada(s), o por otros métodos para afinidad de maduración *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió aquí anteriormente. Un ejemplo preferido de esta metodología es la tecnología de despliegue PROfusion empleada en los Ejemplos (*infra*).

En otro enfoque, los anticuerpos base también pueden ser generados usando métodos de despliegue en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue en levadura, se usan métodos genéticos para atar dominios de anticuerpo a la pared celular de la levadura y mostrarlos sobre la superficie de la levadura. En particular, tal levadura puede ser utilizada para mostrar los dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o librería de anticuerpo combinatorial (p.e., humana o murina). Ejemplos de métodos de despliegue en levadura que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados en la Patente Americana No. 6,699,658 (Wittrup et al.) incorporada aquí mediante referencia.

B. Producción de anticuerpos DLL4 recombinantes

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser producidos mediante cualquiera de un número de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, expresión desde células hospederas, en donde el(los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera son transfectados en una célula hospedera mediante técnicas estándar. Las diferentes formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedera procariótica o eucariótica, p.e., electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospederas procarióticas o eucarióticas, es preferible la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y lo más preferido, en células hospederas mamíferas, porque tales células eucarióticas (y en particular células mamíferas) son más probables que las células procarióticas a ensamblarse y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente plegado.

Células hospederas mamíferas preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216-4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable DHFR, p.e., descritas en Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS y SP2. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican para los genes de anticuerpo son introducidos en las células hospederas mamíferas, los anticuerpos se producen cultivando las células hospederas por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospederas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células hospederas. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándar.

Las células hospederas también se pueden usar para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas de scFv. Se entenderá que variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedera con ADN que codifica fragmentos funcionales de cualquiera de la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. También se puede usar tecnología de AND recombinante para remover algo o todo del ADN que codifica cualquiera o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas de tales moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la invención. Adicionalmente, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los cuales una cadena pesada y una cadena ligera son anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicos para un antígeno diferente a los antígenos de interés entrecruzando un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo mediante métodos de entrecruzamiento químico estándar.

En un sistema preferido para expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo es introducido en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente enlazados a elementos reguladores de potenciador de CMV/promotor de AdMLP para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospederas transformantes seleccionadas son cultivadas para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo y el anticuerpo intacto es recuperado

del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospederas, seleccionar transformantes, cultivar las células hospederas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Aún además la invención provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula hospedera de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

1. Anticuerpos anti-DLL4.

Las secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de anticuerpos totalmente humanos aislados que se unen a DLL4 humano se muestran para los clones E9 y A10 en la Tabla 4 (Ver, Ejemplos, más adelante). Las secuencias de CDR del anticuerpo anti-DLL4 aislado de los anticuerpos E9 y A10 establecen dos familias novedosas de proteínas de unión a DLL4, aisladas de acuerdo con esta invención, y que comprenden polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR derivadas de E9 y clones madurados de afinidad de las mismas o derivados de A10 y clones madurados de afinidad de los mismos. Las regiones variables y CDRs del anticuerpo monoclonal E9 y los derivados madurados de afinidad del mismo se listan en las Tablas 4, 8, 14, 18, y 19. Las regiones variables y las CDRs del anticuerpo monoclonal A10 y los derivados madurados de afinidad del mismo se listan en la Tabla 4, 9, y 10. Para generar y seleccionar CDRs para las proteínas de unión de acuerdo con la invención que tienen unión a DLL4 preferida y/o actividad neutralizante con respecto a DLL4 humano, se pueden usar métodos estándar conocidos en la técnica para generar las proteínas de unión de la presente invención y evaluar la unión a DLL4 y/o características de neutralización de aquella proteína de unión, incluyendo pero sin limitarse a aquellas específicamente aquí descritas.

Con base en la alineación de las secuencias de amino ácido de las CDRs de las regiones variables de cadena pesada (VH) y regiones variables (VL) de cadena ligera de los clones del anticuerpo anti-DLL4 E9 aquí descritos, la invención provee una proteína de unión a DLL4 que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a DLL4 humano, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una o más CDRs seleccionadas del grupo que consiste de:

CDR-H1: X₁- X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ (SEQ ID NO:99), en donde;

X₁ es S o N;
 X₂ es S, G o N;
 X₃ es S, N, T, G o R;
 X₄ es Y;
 X₅ es Y o H;
 X₆ es W; y
 X₇ es G;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO: 100), en donde;

X₁ es D;
 X₂ es I;
 X₃ es Y, N, o S;
 X₄ es Y;
 X₅ es T, N, A, I, S o R;
 X₆ es G;
 X₇ es S, N, T o G;
 X₈ es T;
 X₉ es Y;
 X₁₀ es Y;

X_{11} es N;
 X_{12} es P;
 X_{13} es S;
 X_{14} es L;
 X_{15} es K; y
 X_{16} es S, N, D o G;

CDR-H 3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 101), en donde;

X_1 es E, Y, F, Q, W, L, o A;
 X_2 es D, A, S, G, V, E o N;
 X_3 es V, M, L, P, o A;
 X_4 es I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M o E;
 X_5 es L, Y, F o M;
 X_6 es R, G, S, Q o A
 X_7 es G;
 X_8 es G, A o S;
 X_9 es S, A, L, V, R o G;
 X_{10} es D; y
 X_{11} es Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I M, T, Q, o K;

CDR-L1: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 102), en donde;

X_1 es S;
 X_2 es G;
 X_3 es Q, E o D;
 X_4 es R, S, G, M, K, L o T;
 X_5 es L;
 X_6 es G;
 X_7 es D o E;
 X_8 es K;
 X_9 es Y;

X_{10} es A o V; y

X_{11} es S;

CDR-L2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 103), en donde;

X_1 es E o Q;

X_2 es D;

X_3 es S, L, T, A, E o F;

X_4 es K, T, E, N, Q, S, o M;

X_5 es R;

X_6 es P; y

X_7 es S;

y

CDR-L3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO: 104), en donde;

X_1 es Q;

X_2 es A;

X_3 es W;

X_4 es D;

X_5 es R, S, M, E, N, G, o K;

X_6 es D o E

X_7 es T, V, A, S o M;

X_8 es G, A o C; y

X_9 es V.

Preferiblemente, una proteína de unión a DLL4 que comprende una o más CDRs descrita anteriormente se une a DLL\$ humano ("hu", "h") y también a una o más proteínas de DLL4 seleccionadas del grupo que consiste de: DDL4 de ratón ("murino", "mu"), DLL4 de mono cynomolgus ("cynomolgus", "cyno"), y DLL4 de rata.

Con base en la alineación de las secuencias de amino ácido de las CDRs de las regiones variables de cadena pesada (VH) y las regiones variables de cadena ligera (VL) de los clones A10 del anticuerpo anti-DLL4 aquí descritos, la invención provee una proteína de unión a DLL4 que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a DLL4 humano, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una o más CDRs seleccionadas del grupo que consiste de:

CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO: 105), en donde;

X₁ es S, N, o D;

X₂ es H o Y;

X₃ es W;

X₄ es M; y

X₅ es S o H;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 106), en donde;

X₁ es I, D, M, o T;

X₂ es I;

X₃ es S;

X₄ es Y, N, S, Q, V, T, H, o D;

X₅ es D;

X₆ es G;

X₇ es S, R, I, T, G, K, H, o N;

X₈ es N, Y, S, I, o T;

X₉ es K, M, N, Q, E, T, R, S, A, o L;

X₁₀ es Y, D, o E;

X₁₁ es S o Y;

X₁₂ es A;

X₁₃ es D;

X_{14} es S;
 X_{15} es V;
 X_{16} es K; y
 X_{17} es G;

CDR-H3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} (SEQ ID NO: 107), en donde;

X_1 es A;
 X_2 es G, A, o R;
 X_3 es G;
 X_4 es G, S, o A;
 X_5 es N;
 X_6 es V o M;
 X_7 es G;
 X_8 es F, L, Y, o M;
 X_9 es D; y
 X_{10} es I, S, o L;

CDR-L1: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 108), en donde;

X_1 es S;
 X_2 es A o G;
 X_3 es D;
 X_4 es K, N, L, Q, M, E, S, T, G, o D;
 X_5 es L;
 X_6 es G;
 X_7 es T, S, N, A, G, o E;
 X_8 es K, Q, N, o R;
 X_9 es Y;
 X_{10} es V o I; y
 X_{11} es S;

CDR-L2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 109), en donde;

X_1 es Q;

X_2 es D;

X_3 es A, G, W, S, o D;

X_4 es K, M, Q, N, L, T, I, o E;

X_5 es R;

X_6 es P; y

X_7 es S;

y

CDR-L3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO: 110), en donde;

X_1 es Q;

X_2 es S o A;

X_3 es W;

X_4 es D;

X_5 es R, S, Q, P, A, V, W, o M;

X_6 es S, G, I, N, R, o T

X_7 es D o G;

X_8 es V, A, P, o E; y

X_9 es V.

Preferiblemente, una proteína de unión a DLL4 que comprende una o más CDRs descritas anteriormente se une a DLL4 humano ("hu") y también a DLL4 de mono cynomolgus ("cynomolgus", "cyno").

2. Anticuerpos anti-DLL4 quiméricos.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones del anticuerpo son derivadas de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Ver

p.e., Morrison, *Science*, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., *BioTechniques*, 4: 214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 (1989); Patentes Americanas Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, que están incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad. Adicionalmente, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" mediante genes de corte y empalme de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Ver, por ejemplo, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314: 452-454 (1985), que están incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad.

3. Anticuerpos anti-DLL4 de CDR injertada.

Las secuencias de CDR de anticuerpo anti-DLL4 aisladas de la invención se pueden usar para preparar anticuerpos de CDR injertada para modular las propiedades del anticuerpo original. Tales propiedades incluyen, pero no se limitan a cinética de unión, afinidad, actividades biológicas, reactividad cruzada de especies, reactividad cruzada de molécula, epítipo, propiedades fisicoquímicas, propiedades farmacocinéticas, propiedades farmacodinámicas, o propiedades farmacológicas. Los anticuerpos de CDR injertada comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano o un anticuerpo de primate no humano, en donde una o más de las regiones de CDR de VH y/o VL están reemplazadas con secuencias de CDR del anticuerpo anti-DLL4 original. Una secuencia de marco de cualquier anticuerpo humano o primate no humano puede servir como la plantilla para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo de cadena recta en tal marco conduce a menudo a alguna pérdida de la afinidad de unión al antígeno. Entre más homólogo sea un anticuerpo humano, de otras especies al anticuerpo humano original, menor es la posibilidad que al combinar las CDRs

con el nuevo marco humano o marco de primate no humano se introducirán distorsiones en las CDRs que podrían reducir la afinidad u otras propiedades. Por lo tanto, es preferible que el marco variable que es elegido para reemplazar el marco de región variable humano además de las CDRs, tenga al menos una identidad de secuencia del 30% con el marco de región variable del anticuerpo humano. Es más preferible que el marco de región variable que es elegido para reemplazar el marco de región variable humana además de las CDRs, tenga al menos una identidad de secuencia del 40% con el marco de región variable de anticuerpo humano. Es más preferible que el marco de región variable que es elegido para reemplazar el marco variable humano además de las CDRs tenga al menos una identidad de secuencia del 50% con el marco de región variable del anticuerpo humano. Es más preferible que el marco de región variable que es elegido para reemplazar el marco variable humano además de las CDRs tenga al menos una identidad de secuencia del 60% con el marco de región variable del anticuerpo humano. Es más preferible que el nuevo marco de región variable humano o primate no humano y el humano original además de las CDRs tenga al menos 70% de identidad de secuencia. Es incluso más preferible que el nuevo marco de región variable humano o primate no humano y el humano original, además de las CDRs, tenga al menos 75% de identidad de secuencia. Lo más preferido es que el nuevo marco de región variable humana o primate no humana y el humano original, además de las CDRs, tenga al menos 80% de identidad de secuencia. Incluso usando un marco humano homólogo o primate no humano altamente homólogo para injertar CDRs del anticuerpo anti-DLL4 humano original, el anticuerpo injertado resultante puede aún perder afinidad de unión al antígeno en algún grado. En este caso, para ganar de nuevo la afinidad, es necesario incluir al menos una o más sustituciones de residuo(s) de marco clave(s) del anticuerpo original a la posición correspondiente en el anticuerpo recién injertado. Tal residuo clave puede ser seleccionado del grupo que consiste de:

un residuo adyacente a una CDR;
 un residuo de sitio de glicosilación;
 un residuo raro;
 un residuo capaz de interactuar con DLL4 humano
 un residuo canónico;
 un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y
 región variable de cadena ligera;
 un residuo dentro de una zona Vernier; y
 un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena
 pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada
 primero definido por Kabat.

4. Anticuerpos anti-DLL4 humanizados.

Aunque las composiciones de la presente invención eliminan el
 requerimiento de preparar anticuerpos humanizados, los anticuerpos DLL4
 humanizados se pueden preparar usando las composiciones de la invención.
 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especie no
 humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones
 determinantes de complementariedad (CDRs) de las especies no humanas y
 regiones de marco de una molécula inmunoglobulina humana. Las secuencias
 de Ig humanas conocidas se revelan en los sitios Web disponibles mediante la
 red (www.), p.e., ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; atcc.org/phage/hdb.html;
scquest.com/; abcam.com/; antibodyresource.com/onlinecomp.html;
public.iastate.edu/.about.pedro-/research_tools.html;
mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; whfreeman.com/immunology-
[/CH05/kuby05.htm](http://CH05/kuby05.htm); library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
path.-cam.ac.Uk/.about.mrc7/mikeimages.html; antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks-/Immunology.html; immunologylink.com/;

pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; bio-tech.ufl.edu/.about.hcl/;
pebio.com/pa/340913-/340913.html; nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; biodesign.com/table.asp;
icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html; biotech.ufl.edu-/.about.fccl/protocol.html;
isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html;
baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
ibt.unam.mx/-vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html;
anti-body.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
unizh.ch/.about.honegger/AHO-seminar/SlideOl.html;
cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;
ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.-html;
biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages-/Pept/spottech.html;
jerini.de/frroducts.htm; patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia. Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidez, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos de marco en las regiones de marco humanas pueden estar sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco son identificadas por métodos bien conocidos en la técnica, p.e., mediante modelamiento de las interacciones de los residuos de CDR y marco para identificar los residuos de marco importantes para la unión a antígeno y

comparación de secuencia para identificar los residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Ver, p.e., Patente Americana No. 5,585,089 (Queen et al.); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), que están incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad.) Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis de el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p.e., el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados a partir de secuencias de consenso e importación de forma que se logra la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada para el(los) antígeno(s) objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente y en su mayoría sustancialmente involucrados en la influencia de unión a antígeno. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en el arte, tales como, pero sin limitarse a aquellas descritas en Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988), Sims et al., *J. Immunol*, 151: 2296-2308 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol*, 196: 901-917 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992); Presta et al., *J. Immunol*, 151: 2623-2632 (1993), Padlan, E.A., *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6): 805-814 (1994); Roguska. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :969-973 (1994); Publicaciones PCT Nos. WO 91/09967, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234), WO 92/01047 (PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), WO90/14443, WO90/14424, y WO90/14430; Publicaciones Europea Nos. EP 0 592 106, EP 0

519 596, y EP 0 239 400; Patentes Americanas Nos. 5,565,332; 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; y 4,816,567, cada una incorporada en su totalidad aquí mediante referencia, incluyendo las referencias allí citadas.

C. Producción de anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-DLL4 de la presente invención exhiben una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de angiogénesis de tumor, p.e., evaluada mediante uno cualquiera de los diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. La evaluación de la actividad de DLL4 puede ser evaluada mediante varios ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. Los parámetros ejemplares para evaluar la neutralización de la actividad de DLL4 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que inhiben la interacción de DLL4 con el receptor Notch, y/o ruta de señalización Notch con valores IC_{50} de aproximadamente al menos 10^{-6} M; al menos 10^{-7} M, o al menos 10^{-8} M.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-DLL4 de la presente invención también exhiben una alta capacidad de reducir o neutralizar la actividad de DLL4.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se une a DLL4 humano, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia de DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $0.1s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o que inhibe la actividad de DLL4 y/o DLL4 humano con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-6}M$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo,

se puede disociar del DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir DLL4 humano y/o actividad de DLL4 humano con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-7} M$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir DLL4 humano con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-8} M$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de DLL4 con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-9} M$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir DLL4 y/o actividad de DLL4 humano con IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-10} M$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de DLL4 humano con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir DLL4 y/o actividad de DLL4 humano con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-11} M$ o menos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1 o una región constante de cadena pesada de IgG4. Adicionalmente, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea región constante de cadena ligera

kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Los reemplazos de los residuos de amino ácido en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (ver, Patentes Americanas Nos. 5,648,260 y 5,624,821 (Winter et al.)). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, p.e., inducción de citoquina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y tasa de vida media/depuración de anticuerpo y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso nocivas, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos IgG humanos, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC a través de la unión a FcγRs y complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media circulante de los anticuerpos. En aún otra realización, al menos un residuo de amino ácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de forma que las funciones efectoras del anticuerpo son alteradas.

Una realización provee una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es derivatizado o enlazado a otra molécula funcional (p.e., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención puede ser derivada enlazando funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo (p.e., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente

detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Agentes detectables útiles con los cuales se puede derivar un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalensulfonil cloruro, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede ser derivado con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidada de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se deriva con una enzima detectable, esta es detectada agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede ser derivado con biotina, y detectado mediante medición indirecta de avidina o estreptavidina.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión a DLL4 cristalizada. Preferiblemente, la invención se relaciona con cristales de proteínas de unión a DLL4 aquí descritas, incluyendo anticuerpos anti-DLL4 enteros, fragmentos de los mismos, así como constructos de anticuerpo y conjugados de proteína de unión (incluyendo conjugados de anticuerpo) como se revelan aquí, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una vida media *in vivo* mayor que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión retiene la actividad biológica después de la cristalización. Las proteínas de unión cristalizadas de la invención pueden ser

producidas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y revelados en la Publicación PCT No. WO 02/72636, aquí incorporada mediante referencia.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción de proteína in vivo naciente puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación post-transduccional. En particular, se pueden agregar enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacárido enlazadas covalentemente son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de proteína depende de la secuencia de amino ácido de la proteína de interés, así como de la célula hospedera en la cual se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p.e., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótido) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteína, y la composición de los residuos de glicosilo, puede diferir dependiendo del sistema hospedero en el cual se expresa la proteína particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de forma que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que cambiar la glicosilación de la proteína puede producir características de proteína diferentes. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedero, tal como levadura, y glicosilada utilizando la misma ruta endógena de levadura puede ser reducida comparada con la de la misma proteína expresada en una célula mamífera, tal como una línea celular CHO.

Tales glicoproteínas pueden también ser inmunogénicas en humanos y mostrar vida media *in vivo* reducida después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y promover la rápida depuración de la proteína en la corriente sanguínea. Otros efectos adversos pueden incluir cambios del plegamiento de proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenidad. En consecuencia, un experto médico puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición de glicosilación y patrón idéntico, o al menos similar, al producido en células humanas o en las células específicas de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de la de una célula hospedera puede lograrse modificando genéticamente la célula hospedera para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en el arte, un experto médico puede generar anticuerpos o porción de unión a antígeno de los mismos, que muestran glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, las cepas de levadura han sido modificadas genéticamente para expresar enzimas de glicosilación que no se encuentran naturalmente de forma que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteína idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (Publicaciones de Solicitud de Patente Americana Nos. 2004/0018590 y 2002/0137134).

Adicionalmente, el experto en la técnica apreciará que una proteína de interés puede ser expresada usando una librería de células hospederas diseñada genéticamente para expresar varias enzimas de glicosilación, de forma que las células hospederas de la librería producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un médico experto puede entonces seleccionar y

asilar la proteína de interés con patrones de glicosilación novedosos particulares. Preferiblemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso particularmente seleccionado exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

D. Usos de las proteínas de unión a DLL4.

Dada su habilidad para unirse a DLL4 humano y DLL4 murino, las proteínas de unión a DLL4 aquí descritas, incluyendo anticuerpos y porciones de los mismos, se pueden usar para detectar o medir DLL4 en una muestra (p.e., en una mezcla, solución o muestra biológica, tal como sangre, suero, o plasma), usando cualquiera de los inmunoensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), o una inmunohistoquímica de tejido. La invención provee un método para detectar DLL4 humano y/o DLL4 murino en una muestra, que comprende contactar una muestra con una proteína de unión a DLL4 y detectar ya sea la proteína de unión a DLL4 unida a DLL4 humano y/o DLL4 murino, o la proteína de unión no ligada para de esta forma detectar DLL4 humano y/o DLL4 murino en la muestra. Una proteína de unión a DLL4 aquí descrita puede ser marcada directamente o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección de la proteína de unión a DLL4 unida o no unida. Sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, dansil cloruro o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y ejemplos de material

radioactivo adecuado incluye ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

Las muestras biológicas que se pueden ensayar para DLL4 incluyen orina, heces, sangre, suero, plasma, transpiración, saliva, hisopo oral (mejilla, lengua, garganta), hisopo vaginal, hisopo rectal, hisopo dérmico, raspado dérmico, biopsia de tejido, así como cualquier otra muestra de tejido que puede ser obtenida mediante métodos disponibles en la técnica.

Alternativo al marcado de proteína de unión, DLL4 humano puede ser ensayado en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia utilizando estándares de DLL4 humano recombinante (rh) marcados con una sustancia detectable y una proteína de unión a DLL4 no marcada aquí descrita. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares de rhDLL4 marcados, y la proteína de unión a DLL4 son combinados y se determina la cantidad de estándar de rhDLL4 marcado a la proteína de unión no marcada. La cantidad de DLL4 humano en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhDLL4 marcado unido a la proteína de unión a DLL4. Igualmente, DLL4 humano también puede ser ensayado en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo utilizando estándares de rhDLL4 marcados con una sustancia detectable y una proteína de unión a DLL4 no marcada aquí descrita.

Las proteínas de unión a DLL4 de la invención son preferiblemente capaces de neutralizar la actividad de DLL4, en particular actividad de hDLL4, tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, tales proteínas de unión de la invención se pueden usar para inhibir la actividad de DLL4, p.e., en un cultivo celular que contiene DLL4, en sujetos humanos, o en otros sujetos mamíferos que expresan un DLL4 con el cual reacciona cruzadamente una proteína de unión de la invención. En una realización, la invención provee un método para

inhibir la actividad de DLL4, que comprende contactar un DLL4 con un anticuerpo a DLL4 o porción de anticuerpo de la invención de forma que se inhibe la actividad de DLL4. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene o se sospecha que contiene DLL4, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede ser agregado al medio de cultivo para inhibir la actividad de DLL4 en el cultivo.

En otra realización, la invención provee un método para reducir la actividad de DLL4 en un sujeto, convenientemente de un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno en el cual DLL4 o la actividad de DLL4 es perjudicial. La invención provee métodos para reducir DLL4 o la actividad de DLL4 en un sujeto que sufre de tal enfermedad o trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto una proteína de unión a DLL4 de la invención de forma que DLL4 o la actividad de DLL4 en el sujeto es reducida. Preferiblemente, el DLL4 es DLL4 humano, y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un DLL4 al cual es capaz de unirse una proteína de unión a DLL4. Aún adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el cual se ha introducido DLL4 (p.e., mediante administración de DLL4 o mediante expresión de un transgén de DLL4). Un anticuerpo u otra proteína de unión a DLL4 de la invención puede ser administrada a un sujeto humano para propósitos terapéuticos. Más aún, una proteína de unión a DLL4 de la invención puede ser administrada a un mamífero no humano que expresa un DLL4 con el cual la proteína de unión es capaz de unirse para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y otras proteínas de unión a DLL4 de la invención (p.e., evaluación de dosificaciones y cursos de tiempo de administración).

Como se usa aquí, el término "un trastorno en el cual DLL4 y/o la actividad de señalización Notch es perjudicial" pretende incluir enfermedades, tales como cáncer, y otros trastornos en los cuales se ha demostrado que la presencia de DLL4 y/o actividad de señalización Notch en un sujeto que sufre del trastorno, es o se sospecha que es responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. En consecuencia, un trastorno en el cual DLL4 y/o la actividad de señalización Notch es perjudicial, es un trastorno en el cual se espera que la alteración de DLL4 y/o actividad de señalización Notch alivie los síntomas y/o progresión del trastorno (p.e., crecimiento de tumor). Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un aumento de la angiogénesis en un sujeto que sufre del trastorno (p.e., un aumento de la concentración de varias proteínas conocidas en la técnica que aumentan en suero, plasma, fluido sinovial, etc., del sujeto durante el crecimiento y formación de tumor), que puede ser detectado, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-DLL4 descrito anteriormente. Ejemplos no limitantes de trastornos que pueden ser tratados con los anticuerpos de la invención incluyen aquellos trastornos discutidos en la siguiente sección relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

II. Composiciones Farmacéuticas.

La invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a DLL4 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de unión a DLL4 de la invención son para uso en, pero sin limitarse a, diagnóstico, detección, o monitoreo de un trastorno, para prevenir, tratar, manejar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende una o más proteínas de unión a DLL4 de la invención. En otra

realización, la composición farmacéutica comprende una o más proteínas de unión de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes a las proteínas de unión de la invención para tratar un trastorno en el cual DLL4 y/o actividad de DLL4 es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles para, o que han sido o están siendo usados en la prevención, tratamiento, manejo o mejoramiento de un trastorno, tal como cáncer o un tumor, o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender además un vehículo, diluyente o excipiente.

Las proteínas de unión de la invención pueden ser incorporadas en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión a DLL4 (o porción de unión a DLL4 de la misma) de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, preservantes o amortiguadores, que potencian la vida en conservación o efectividad del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar una o más proteínas de unión a DLL4 de la invención o la combinación de una o más proteínas de unión de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, manejar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, p.e., reducir la angiogénesis de tumor, encapsulación en liposomas, p.e., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la proteína de unión a DLL4, endocitosis mediada por receptor (ver, p.e., Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a., administración parenteral (p.e., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración mucosa (p.e., rutas intranasal y oral). En adición, se puede emplear la administración pulmonar, p.e., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerolizante. Ver, p.e., Patentes Americanas Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales está aquí incorporada mediante referencia en su totalidad. En una realización, una proteína de unión a DLL4 de la invención, terapia de combinación, o una composición de la invención es administrada usando la tecnología de liberación de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención son administrados intramuscularmente, intravenosamente, intratumoralmente, oralmente, intranasalmente, pulmonarmente, o subcutáneamente. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden ser administrados por cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (p.e.,

mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a manera de limitación, mediante infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (p.e., Tissuel®), o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad efectiva de uno o más antagonistas de las proteínas de unión a DLL4 de la invención localmente al área afectada en un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o aliviar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad efectiva de una o más proteínas de unión a DLL4 de la invención localmente al área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (p.e., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes a una proteína de unión de la invención, en un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede ser liberado en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, se puede usar una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (ver, Langer (*Science*, 249: 1527-1533 (1990)); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14: 201-240 (1987); Buchwald et al., *Surgery*, 88: 507-516 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para lograr liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención. Ver, p.e., Goodson, J. M, *In Medical Applications of Controlled Release. Vol. II. Applications and Evaluations*. (Langer y Wise, eds.), (CRC Press Inc., Boca Raton, 1984),

capítulo 6, páginas 115-138; Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance. Smolen y Ball (eds.) (Wiley, New York, 1984); Langer y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126 (1983); ver también, Levy et al., *Science*, 228: 190-192 (1985); During et al., *Ann. Neurol*, 25: 351-356 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71 : 105-112 (1989); Patentes Americanas Nos. 5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463; y 5,128,326; y Publicaciones PCT Nos. WO 99/15154 y WO 99/20253. ; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólicos (PLG), polianhídridos, poli(N- vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poliacrilamida, poli(etilen glicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólicos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas removibles, estable al almacenamiento, estéril, y biodegradable. En ya otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida puede ser colocado en la proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo así solamente una fracción de la dosis sistémica (ver, p.e., Goodson, In Medical Applications of Controlled Release. (1984). Páginas 115-138).

Los sistemas de liberación controlada son discutidos en la revisión de Langer (*Science*, 249: 1527-1533 (1990)). Se puede usar cualquier técnica conocida por el experto en el arte para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, p.e., Patente Americana No. 4,526,938; Publicaciones PCT Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., "*Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel*," *Radiother. Oncol*, 39: 179-189 (1996); Song et al., "*Antibody Mediated Lung Targeting de*

Long-Circulating Emulsions", PDA J. Pharm. Sci.Tech., 50: 372-377 (1996); Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Proceed. Intl. Symp. Control Rel Bioact. Mater., 24: 853-854 (1997), y Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery" Proceed. Intl. Symp. Control Rel Bioact. Mater.: 24: 759-760 (1997), cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede ser administrado in vivo para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de forma que se vuelva intracelular, p.e., mediante el uso de un vector retroviral (ver Patente Americana No. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartícula (p.e., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en enlace con un péptido del tipo homeobox que es conocido por entrar al núcleo (ver, p.e., Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1864-1868 (1991)). Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula hospedera para expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Ejemplos de rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral (p.e., intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (p.e., inhalación), transdérmica (p.e., tópica), transmucosa, y administración rectal. En una realización específica, la composición es formulada de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa,

subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención serán administradas tópicamente, las composiciones pueden ser formuladas en la forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, atomizador, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por el experto en la técnica. Ver, p.e., Remington's Pharmaceutical Sciences y Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms. 19 ed. (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). para formas de dosificación tópicas no atomizables, se emplean típicamente formas semisólidas o sólidas viscosas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que la del agua. Formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, bálsamos, y similares, que están, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (p.e., preservantes, estabilizantes, agentes humectantes, amortiguadores, o sales) para influir en varias propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol atomizables en donde el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, es empacado en una mezcla con un volátil presurizado (p.e., un propelente gaseoso, tal como FREON®) o en una botella exprimible. También se pueden agregar humectantes o hidratantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación, si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si un método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición puede ser formulada en una forma de aerosol, atomizador, rocío o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser liberados convenientemente en la forma de una presentación en atomizador de empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p.e., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionando una válvula para liberar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos (compuestos de, p.e., gelatina) para uso en un inhalador o insuflador pueden ser formuladas conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si un método de la invención comprende administración oral, las composiciones pueden ser formuladas oralmente en la forma de tabletas, cápsulas, cachets, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Las tabletas o cápsulas pueden ser preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p.e., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (p.e., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (p.e., estearato de magnesio, talco, o sílice); desintegrantes (p.e., almidón de papa o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (p.e., lauril sulfato de sodio). Las tabletas pueden ser recubiertas por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitarse a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser presentados como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptable tales como agentes de suspensión (p.e.,

jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsificantes (p.e., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p.e., aceite de almendra, ésteres oleosos, etil alcohol, o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (p.e., metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden también contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes, y endulzantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden ser convenientemente formuladas para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

Un método de la invención puede comprender administración pulmonar, p.e., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Ver, p.e., Patentes Americanas Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la invención es administrada usando tecnología de liberación de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US).

Un método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (p.e., mediante inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden estar presentadas en formas de dosificación unitaria (p.e., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples) con un preservante agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o

dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (p.e., agua libre de pirógeno estéril) antes de uso.

Un método de la invención puede adicionalmente comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones depósito. Tales formulaciones de acción larga pueden ser administradas mediante implantación (p.e., subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden ser formuladas con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (p.e., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (p.e., como una sal moderadamente soluble).

Los métodos abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2- etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones son suministrados ya sea separadamente o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es infusión, la composición puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es por inyección, se puede proveer una ampolla de agua estéril

para inyección o solución salina de forma que los ingredientes pueden ser mezclados antes de la administración.

En particular, la invención también provee que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención sean empacados en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención es suministrado como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y puede ser reconstituido (p.e., (p.e., con agua o solución salina) a la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferiblemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministradas como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado en una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben ser almacenadas entre 2°C y 8°C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deben ser administradas dentro de 1 semana, preferiblemente, dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de ser reconstituida. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministrados en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del agente. Preferiblemente, la forma líquida de la composición administrada es suministrada en un recipiente herméticamente sellado de al menos 0.25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0.5 mg/ml, al menos 1

mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe ser almacenada entre 2° C y 8° C en su recipiente original.

Las proteínas de unión de la invención pueden ser incorporadas en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferiblemente, la proteína de unión se prepararán como una solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta de un líquido o una forma de dosificación liofilizada en un flint o vial ámbar, ampolla o jeringa pre-llenada. El amortiguador puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros amortiguadores adecuados incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes volumétricos para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (óptimamente 2-4%). Se pueden usar estabilizantes en las formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes volumétricos adecuados incluyendo glicina, arginina, pueden ser incluidos como 0-0.05% de polisorbato-80 (óptimamente 0.005-0.01%). Surfactantes adicionales incluyen, pero no se limitan a polisorbato 20 y surfactantes BRIJ.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p.e., soluciones inyectables e

infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones típicas preferidas están en la forma de soluciones inyectables o en infusión, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (p.e., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, una proteína de unión a DLL4 aquí descrita es administrada por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, una proteína de unión a DLL4 es administrada mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas deben típicamente ser estériles bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo (p.e., anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por aspersión que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La absorción prolongada de las

composiciones inyectables puede ser provocada incluyendo en la composición, un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las proteínas de unión a DLL4 de la presente invención pueden ser administradas mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como lo apreciará el experto, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede ser preparado con un vehículo que protegerá el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

En ciertas realizaciones, una proteína de unión de la invención puede ser administrada oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) pueden también estar encerrados en una cápsula de gelatina de cáscara blanda o dura, comprimido en tabletas, o incorporado directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden ser incorporados con excipientes y usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trozos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante administración diferente a

parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos complementarios a las composiciones. En ciertas realizaciones, una proteína de unión de la invención es coformulada con y/o coadministrada con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los cuales la actividad de DLL4 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-huDLL4 o porción de anticuerpo de la invención puede ser coformulado y/o coadministrado con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos (p.e., anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de superficie celular). Adicionalmente, una o más proteínas de unión de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

En ciertas realizaciones, una proteína de unión a DLL4 de la invención está enlazada a un vehículo que extiende la vida media conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan al dominio Fc, polietilen glicol, y dextrano. Tales vehículos están descritos, p.e., en la Patente Americana US No. 6,660,843 B1 y Publicación PCT publicada No. WO 99/25044, las cuales están aquí incorporadas mediante referencia.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótido que codifican para un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, son administradas para tratar, prevenir, manejar, o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo a manera de terapia del gen. La terapia del gen se refiere

a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que se puede expresar. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para la terapia del gen disponibles en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia del gen, ver Goldspiel et al., *Clin. Pharmacy*, 12: 488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260: 926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217 (1993); Robinson, C, *Trends Biotechnol*, 11(5):155 (1993). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar, están descritos en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual. (Stockton Press, New York, 1990). Las descripciones detalladas de varios métodos de terapia del gen están revelados en la Publicación de Solicitud de Patente Americana No. 20050042664 A1, que está incorporada aquí mediante referencia.

En otro aspecto esta invención provee un método para el tratamiento (p.e. curación, supresión, alivio, retraso o prevención de aparición de, o prevención de recurrencia o recaída de) o prevención de un tumor asociado con DLL4 en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto una proteína de unión a DLL4, p.e., un anticuerpo anti-DLL4 o fragmento del mismo como se describe aquí, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el tumor o cáncer asociado con DLL. El antagonista de DLL4, p.e., el anticuerpo anti-DLL4 o fragmento del mismo, puede ser administrado a un sujeto solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas aquí descritas.

El DLL4 juega un papel crítico en la patología asociada con una variedad de enfermedades que involucran elementos inmunes e inflamatorios, en particular cáncer y angiogénesis de tumor. Ejemplos de trastornos asociados con DLL4 incluyen, pero no se limitan a, aquellos trastornos que efectúan de manera adversa los siguientes procesos biológicos: función y desarrollo neuronal; estabilización del destino y angiogénesis endotelial arterial; regulación de los eventos de comunicación celular crucial entre endocardio y miocardio durante tanto la formación de la válvula primordial y como el desarrollo y diferenciación ventricular; homeóstasis de válvula cardíaca, así como implicaciones con otros trastornos humanos que involucran el sistema cardiovascular; especificación del linaje celular oportuno tanto del páncreas endocrino como exocrino; influencia de las decisiones del destino binario de células que deben elegir entre los linajes secretor y de absorción en el intestino; la expansión del compartimiento de célula madre hematopoyética durante el desarrollo óseo y participación en el compromiso al linaje osteoblástico tal como osteoporosis; regulación de la decisión de destino celular de glándulas mamarias en varias etapas del desarrollo distintas; y ciertos mecanismos no nucleares, tales como control del citoesqueleto de actina mediante la tirosina quinasa Ab1. Más específicamente, los trastornos asociados con DLL4 incluyen, pero no se limitan cánceres, T-ALL (leucemia linfoblástica aguda de célula T), CADASIL (Arteriopatía Dominante Autosomal Cerebral con Infartos Sub-corticales y Leucoencefalopatía), MS (Esclerosis múltiple), Tetralogía de Fallot, y síndrome de Alagille. Preferiblemente, los anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de los mismos aquí descritas, se usan para tratar cánceres y tumores.

Las proteínas de unión de acuerdo con la invención se pueden usar solas o en combinación, p.e., más de una proteína de unión a DLL4 aquí descrita, para tratar un cáncer, un tumor, u otro trastorno en el cual se considera deseable o de otra forma benéfica la unión a, inhibición de, y/o neutralización de DLL4, para la salud de un individuo.

Se debe entender que las proteínas de unión a DLL4 de la invención también se pueden usar solas o en combinación con un agente adicional, p.e., un agente terapéutico, siendo dicho agente adicional seleccionado por el médico experto para su propósito previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para tratar un cáncer, tumor, u otra enfermedad o condición en la cual se considera que la unión a, o inhibición de DLL4 o, es deseable o ventajosa para el tratamiento del cáncer, tumor, u otra enfermedad o condición. El agente adicional puede ser un agente que confiere un atributo benéfico a la composición terapéutica p.e., un agente que afecta la viscosidad de la composición .

Se debe entender adicionalmente que las combinaciones que se incluirán en esta invención son aquellas combinaciones útiles para su propósito previsto. Los agentes indicados a continuación son para propósitos ilustrativos y no pretenden ser limitados. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de la siguiente lista. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, p.e., dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

Las combinaciones preferidas son fármaco(s) anti-inflamatorio(s) no esteroidal(es) también referidos como AINES, que incluyen fármacos como ibuprofeno. Otras combinaciones preferidas son corticosteroides incluyendo prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroide pueden ser reducidos o incluso eliminados incluso eliminados reduciendo gradualmente la dosis de esteroide requerida en el tratamiento de pacientes en combinación con los anticuerpos anti-DLL4 es esta invención. Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para artritis reumatoide con los cuales se

puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: fármaco(s) anti-inflamatorio supresor de citoquina (CSAIDs); anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos de las rutas de señalización pro-tumorigénicas o pro-angiogénicas. Ejemplos preferidos de agentes terapéuticos útiles en los métodos y composiciones de la invención incluyen agentes antineoplásicos, radioterapia, y quimioterapia, tales como agentes alquilantes de ADN, cisplatino, carboplatino, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicin, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, irinotecan, inhibidores de tirosina quinasa receptora (p.e., erlotinib, gefitinib), inhibidores COX-2 (p.e., celecoxib), e inhibidores de quinasa.

Las proteínas de unión a DLL4 de la invención también pueden ser combinadas con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxiclороquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticosteroides (orales, inhalados y de inyección local), agonistas del beta-2 adrenoreceptor (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifen, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, AINES, por ejemplo, ibuprofeno,

corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosin, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como o IL-1 (p.e., IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1bTNF α (TACE), inhibidores de la enzima convertidora de célula T, inhibidores de la señalización de TNF α tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e., receptores de TNF p55 o p75 solubles y los derivados p75TNFRlgG (Enbrel™ y p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas anti-inflamatorias (p.e., IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxyclorequina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxen, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, metilprednisolona acetato, tiomalato de oro y sodio, aspirina, triamcinolona acetona, propoxifeno napsilato/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac, diclofenaco sodio, oxaprozina, oxicodona hcl, hidrocodona bitartrato/apap, diclofenaco sodio/misoprostol, fentanilo, anakinra, recombinante humano, tramadol hcl, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofen, alendronato sodio, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, glucosamina sulf/condroitina, amitriptilina hcl, sulfadiazina, oxicodona hcl/acetaminofen, olopatadina hcl, misoprostol, naproxeno sodio, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Las combinaciones preferidas incluyen metotrexato o leflunomida y en casos de artritis reumatoide moderada o severa, ciclosporina.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para cánceres con los cuales se puede combinar una proteína de unión a DLL4 de la invención incluyen los

siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipooxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β ; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos a o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90, o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tal como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con o IL-1 (p.e., IRAK, NIK, señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNF α IKK, p38 o inhibidores de MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e., receptores de TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p.e., IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β).

Otros ejemplos de agentes terapéuticos con los cuales se puede combinar una proteína de unión a DLL4 de la invención incluyen los siguientes:

antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, D2E7 (Publicación PCT No. WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, (p75TNFRlgG (ENBREX®) y p55TNFRlgG (LENERCEPT)) e inhibidores de PDE4. Las proteínas de unión de la invención pueden ser combinadas con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de unión de la invención también se pueden combinar con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de las citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β e IL-1ra. Las proteínas de unión a DLL4 de la invención también se pueden usar con inhibidores de la señalización de célula T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa 6-mercaptopurinas. Las proteínas de unión a DLL4 de la invención se pueden combinar con IL-11. Las proteínas de unión de la invención pueden ser combinadas con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, metilprednisolona succinato de sodio, difenoxilato/sulfato atrop, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/agua con dextrosa, hidrocodona bitartrato/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, oxicodona hcl/acetaminofen, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, policarbofil, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, colesevelam hcl, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferon-gamma.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos con los cuales se puede combinar una proteína de unión de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem,

dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina calcio, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, verapamil hcl, digoxin, propranolol clorhidrato, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, enalapril maleato, nadolol, ramipril, enoxaparin sodio, heparina sodio, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimibe, bumetanida, losartan potasio, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, bisoprolol fumarato.

Las composiciones farmacéuticas de la invención puede incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de una proteína de unión de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de unión puede ser determinada por un experto en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la proteína de unión para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial de la proteína de unión es superado por los efectos terapéuticos benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estado temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosis pueden ser ajustados para proveer la respuesta deseada óptima (p.e., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o aumentada de acuerdo a las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente

ventajoso formular composiciones parenterales en formas de dosis unitarias para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención son dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplar, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una proteína de unión a DLL4 de la invención es 0.1-20 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg. Se notará que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de la condición a ser aliviada. Se entenderá además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados en el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación indicados aquí son ejemplares solamente y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

Será obvio para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención aquí descritos son obvios y se pueden hacer usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones aquí reveladas. Habiendo ahora descrito la presente invención en detalle, la misma será entendida más claramente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, los cuales están

incluidos para propósitos de ilustración solamente y no pretenden ser limitantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayos *In vitro* Usados para Determinar la Actividad Funcional de los Anticuerpos a DLL4.

Ejemplo 1.1: Determinación de Afinidad Usando la Tecnología de Resonancia de Plasmón Superficial BIACORE®.

El ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE® (Biacore, Inc., Piscataway, New Jersey, US) determina la afinidad de los anticuerpos con medidas cinéticas de las constantes de asociación y disociación. Las uniones de los anticuerpos DLL4 a un dominio extracelular DLL4 recombinante purificado se determinan mediante mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore® (ya sea un Biacore 2000, Biacore 3000, o Biacore T100; GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, US) usando amortiguador de corrida HBS-EPB (HEPES 10 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0.1 mg/ml de BSA y surfactante P20 al 0.005%) a 25°C. Por ejemplo, aproximadamente 9000 RU de anticuerpo policlonal específico de cabra anti-FC humana (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, US) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmovilizaron directamente a lo largo de un chip biosensor grado investigación CM5 usando un equipo de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante y procedimientos a 25 µg/ml. Las porciones sin reaccionar sobre la superficie del biosensor fueron bloqueadas con etanolamina. Para el análisis cinético, se ajustaron las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 simultáneamente para múltiples inyecciones de antígeno (usando análisis de ajuste global) con el uso del software Scrubber 2 (BioLogic

Software), software Biacore Biaevaluation 4.0.1 o software de evaluación Biacore T100. Los anticuerpos purificados son diluidos en amortiguador de corrida para la captura a lo largo de las superficies de reacción de cabra anti-Fc humana. Los anticuerpos a ser capturados como un ligando (1 µg/ml) son inyectados sobre las matrices de reacción a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Durante el ensayo, todas las mediciones fueron referenciadas contra la superficie de captura sola (p.e., sin anticuerpo anti-DLL4 capturado). Se determinan las constantes de velocidad de asociación y disociación, K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y K_{off} (s^{-1}) bajo una velocidad de flujo continua de 80 µl/min. Las constantes de velocidad son derivadas haciendo mediciones de unión cinética a diferentes concentraciones de antígeno que varían de 1.23 - 900 nM, como una serie de 3-veces de dilución, e incluyeron inyecciones de amortiguador solamente (a ser usadas para doble referencia). Entonces se calcula la constante de disociación en equilibrio K_D (M) de la reacción entre los anticuerpos y el antígeno objetivo a partir de las constantes de velocidad cinética mediante la siguiente formula: $K_D = K_{off}/K_{on}$. La unión es registrada como una función del tiempo y se calculan las constantes de velocidad cinética. En este ensayo, se pueden medir velocidades de asociación tan rápidas como $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y velocidades de disociación tan lentas como $10^{-6} s^{-1}$.

Ejemplo 1.2: Unión de los anticuerpos a DLL4 al Dominio Extracelular de DLL4 Soluble Determinado mediante ELISA.

Método 1 (ELISA de Captura).

Se cubrieron placas Nunc-Immuno de 96 pozos (#439454) con 5 µg/ml de anticuerpo contra IgG humano (específico del fragmento Fcγ, Jackson ImmunoResearch, #109-005-098, 100 µl/pozo) en D-PBS (Gibco #14190) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas de ELISA fueron lavadas 3 con amortiguador de lavado (PBS, Tween-20 al 0.05%) y luego se bloquearon con

200 µl/pozo de amortiguador de bloqueo (D-PBS, BSA al 1%, CaCl_2 1 mM, Tween-20 al 0.05%) por 1 hora a 25°C. Las placas fueron lavadas 3 veces e incubadas con 100 µl/pozo de anticuerpos DLL4 (0.0001-100 nM, dilución serial 10-veces en amortiguador de bloqueo) por 1 hora a 25°C, y luego se lavaron de nuevo 3 veces. Las placas que contienen anticuerpo DLL4 capturado fueron incubadas con dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina (10 nM en amortiguador de bloqueo, 100 µl/pozo) por 1 hora a 25°C, lavadas 3 veces, e incubadas con estreptavidina conjugada con HRP (KPL #474-3000, dilución 1:10,000 en amortiguador de bloqueo, 100 µl/pozo) por 1 hora a 25°C. Después del lavado final, las placas fueron incubadas con 100 µl/pozo de sustrato de ELISA (Ultra TMB-ELISA 1-Paso, Pierce #340280). La reacción se detuvo después de 2 minutos a 25°C con 100 µl/pozo de H_2SO_4 2N y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los datos fueron analizados usando el software Graphpad Prism y se reportaron los valores EC_{50} .

Método 2 (placa recubierta con cobre).

Placas recubiertas con cobre de 96-pozos (Thermo Scientific #15143) fueron lavadas 3 veces con amortiguador de lavado (PBS, Tween-20 al 0.05%) antes de uso, y luego se incubaron con 100 µl/pozo de DLL4-his humano o DLL4-his de ratón o DLL4-his cyno a 1 µg/ml en PBS, 1 hora a 25°C con agitación. Las placas fueron entonces lavadas 3 veces. Luego se agregaron 100 µl/pozo de anticuerpos anti-DLL4 de rata recombinante/quimérico humano o humano recombinante a la placa (0.00164-27 nM, dilución serial 4-veces en amortiguador de ELISA = PBST, Superblock al 10% (Pierce #37515)) por 1 hora a 25°C con agitación, y luego se lavaron de nuevo 3 veces. Las placas fueron incubadas con HRP anti-humano de cabra (Pierce #31412) (dilución 1:40,000 en amortiguador de ELISA, 100 µl/pozo) por 1 hora a 25°C con agitación, luego se lavaron 3 veces. Después del lavado final, las placas fueron incubadas con 100 µl/pozo de sustrato de ELISA (Sigma #T8665). La reacción

fue detenida después de 8 minutos a 25°C con 100 µl/pozo de HCl 1N y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los datos fueron analizados usando el software Graphpad Prism y se reportaron los valores EC₅₀.

Ejemplo 1.3: Unión de Anticuerpos DLL4 Monoclonales a la Superficie de Líneas Celulares de Tumor Humano Evaluadas mediante Citometría de Flujo (FACS).

Líneas celulares estables que sobre expresan DLL4 de superficie celular fueron recolectadas de frascos de cultivo tisular, lavadas cuatro veces y resuspendidas en solución salina amortiguada de fosfato (PBS) que contiene albúmina de suero bovino al 1% y CaCl₂ 1 mM (amortiguador de FACS). Se incubaron 1.5×10^5 células con anticuerpos a diferentes concentraciones en amortiguador de FACS por 60 minutos sobre hielo. Las células fueron lavadas dos veces y se agregaron 50 µL de IgG anti-rata conjugado con R-ficoeritrina, fragmento F(ab')₂ (dilución 1:200 en amortiguador de FACS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, Cat.# 12-116-072). Después de una incubación sobre hielo (4°C, 60 minutos), las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas en amortiguador de FACS. Se midió la fluorescencia usando un Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US). Los datos fueron analizados usando el software Graphpad Prism y se reportaron los valores EC₅₀ como la concentración de anticuerpo para lograr 50% de la unión máxima de anticuerpos que se unen a células que expresan DLL4.

Ejemplo 1.4: Inhibición de la Interacción de Notch-1 con el Dominio Extracelular de DLL4 Soluble por los Anticuerpos DLL4 (ELISA de competencia).

Placas Nunc-Immuno de 96 pozos (#439454 para ELISA de huDLL4) y placas Costar de 96 pozos (#9018 para ELISA de muDLL4) fueron recubiertas con Notch-1 humano 16 nM (R&D Systems #3647-TK, 100 µl/pozo en D-PBS) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas fueron entonces lavadas 3 veces con amortiguador de lavado (PBS, Tween-20 al 0.05%) y bloqueadas con 200 µl/pozo de amortiguador de bloqueo (D-PBS, BSA al 1%, CaCl₂ 1 mM, Tween-20 al 0.05%) por 1 hora a 25°C. Mientras se bloqueaban, el dominio extracelular de DLL4 humano marcado con biotina (14 nM) se mezcló con anticuerpo (30 pM-66 nM, dilución serial 3-veces en amortiguador de bloqueo) por 1 hora a 25°C con agitación. Las placas de ensayo fueron lavadas después del bloqueo, e incubadas con mezclas de DLL4/anticuerpo (100 µl/pozo, 1 hora a 25°C con agitación). Las placas fueron lavadas de nuevo y se agregaron 100 µl/pozo de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald #65R-S104PHRPx, diluida 1:5,000 en amortiguador de bloqueo) por 1 hora a 25°C con agitación. Después de un lavado final, las placas fueron desarrolladas usando 100 µl/pozo de sustrato (TMB Sigma #T8665), y la reacción se detuvo después de una incubación de 8 minutos a 25°C (para ELISA de muDLL4) y después de incubación de 20 minutos a 25°C (para ELISA de huDLL4) usando 100 µl/pozo de HCl 1N, y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los datos fueron analizados usando el software Graphpad Prism y se reportaron los valores IC₅₀ como la concentración de anticuerpo para lograr 50% de reducción de DLL4 unido a Notch 1.

Ejemplo 1.5: Bloqueo de la Unión de Notch Soluble a Células 293G que sobreexpresan DLL4 por los Anticuerpos Anti-DLL4 Monoclonales Evaluada mediante Citometría de Flujo (FACS de competencia).

Ensayo de Bloqueo de Notch: Brevemente, líneas celulares estables que sobre expresan DLL4 de superficie celular fueron recolectadas de frascos de cultivo tisular y re-suspendidas en solución salina amortiguada de fosfato (PBS)

que contiene albúmina de suero bovino al 1% y CaCl_2 1 mM (amortiguador de FACS). Células HEK293-hDLL4 o HEK293-mDLL4 fueron dispensadas en placas de 96 pozos (fondo en v) a 1.5×10^5 células/pozo en amortiguador de FACS. Después de centrifugar las células y descartar el sobrenadante, se agregaron 50 μL de IgG purificado con dilución apropiada a cada pozo, y se incubaron en hielo a 4°C por 60 minutos, seguido por la adición de 50 μL /pozo de Notch 1-biotina a 0.2 $\mu\text{g/mL}$ para hDLL4-293G o 2.0 $\mu\text{g/mL}$ para mDLL4-293G (1.0 o 0.1 $\mu\text{g/mL}$ final) por 1 hora de incubación adicional en hielo a 4°C . Después de lavar las células dos veces con amortiguador de FACS, se agregaron 50 μL de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (dilución 1:150 en amortiguador de FACS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, catálogo no. 016-110-084). Después de una incubación en hielo (4°C , 60 minutos), las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas en amortiguador de FACS. Se midió la fluorescencia usando un Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los datos fueron analizados usando el software Graphpad Prism y se reportaron los valores IC_{50} como la concentración de anticuerpo para lograr el 50% de reducción de Notch 1 unido a las células que expresan DLL4.

Ejemplo 1.6: Inhibición del Aumento dependiente de DLL4 de sVEGFR1 (sFLT1) en Células EA.hy926 por los Anticuerpos DLL4.

Placas de cultivo tisular de 96 pozos fueron recubiertas con 100 μL /pozo de dominio extracelular de DLL4 humano a 1.67 mg/mL en D-PBS (Gibco #14190) y se incubaron durante la noche a 4°C . Las placas fueron lavadas una vez con D-PBS y se sembraron 4000 células EA.hy926/pozo en la ausencia o presencia de los anticuerpos. Se midió la proliferación celular cuatro días después usando el Kit de Ensayo de Proliferación Celular CyQUANT (Invitrogen, #C35007). Se detectó la expresión de sVEGFR1 en el medio acondicionado mediante un kit de ELISA según las recomendaciones del fabricante (R&D Systems

#DVR100B). Los niveles de sVEGFR1 fueron normalizados a la RFU determinada mediante el ensayo CyQUANT para justificar las diferencias de la proliferación celular.

Ejemplo 1.7: Inhibición de la Activación de Notch dependiente de DLL4 en Células EA.hy926 por los Anticuerpos DLL4 usando el ensayo de Reportero Notch.

Placas de cultivo tisular de fondo claro negro de 96 pozos fueron sembradas durante la noche con 7000 células/pozo de células EA.hy926 diseñadas genéticamente, que expresan luciferasa accionada por un promotor sensible a Notch. Los anticuerpos diluidos serialmente de 200 nM fueron mezclados por 15 minutos con un volumen igual de 5000 células HEK293G/pozo que expresan DLL4 de longitud total. Las células 293G/DLL4 fueron co-cultivadas con células reporteras Notch EA.hy926 por 24 hrs en la presencia de anticuerpos de prueba. Se analizó la actividad de Luciferasa mediante el sustrato Promega (Promega # E2940).

Ejemplo 1.8: Métodos y Técnicas analíticas para la identidad de molécula y las caracterizaciones de propiedad fisicoquímica.

Método de Precipitación de PEG.

El uso de PEG para inducir la separación de fase de una proteína sólida de acuerdo con los principios de exclusión de volumen representa un criterio viable para evaluar la solubilidad de una proteína. El PEG tiene varias ventajas sobre otros precipitadores, incluyendo desnaturalización mínima de proteínas a temperaturas ambiente (no afecta la estructura terciaria de las proteínas) y dentro del rango de 4°C a 30°C no se requiere control de temperatura, p.e., los

estudios de precipitación se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente en la mesa de laboratorio.

Generalmente, la precipitación de proteínas por los PEGs se explica sobre la base de los efectos de exclusión de volumen. De acuerdo con esta teoría, las proteínas son estéricamente excluidas de las regiones de solvente que son ocupadas por cadenas lineales de PEG. Como resultado, las proteínas son concentradas y eventualmente precipitadas cuando se excede su solubilidad. En términos termodinámicos, la exclusión estérica conduce a un aumento del potencial químico de la proteína hasta que excede el de la del estado sólido puro, produciendo la precipitación de proteína. Esto pasa principalmente debido a una gran energía libre desfavorable de interacción entre PEG y las proteínas, reduciendo la hidratación preferencial de la proteína debido a efectos de exclusión estérica. En soluciones acuosas, la hidratación preferencial ayuda a mantener la estructura nativa de las proteínas. Generalmente, la exclusión de volumen ha mostrado ser más efectiva con el aumento del peso molecular del PEG, p.e., se necesita menos PEG para precipitar proteínas con peso molecular de PEG en aumento.

Se eligió un PEG de peso molecular de 3000 para estimar la solubilidad de los anticuerpos cubiertos por esta patente. Se preparó una solución de PEG al 50% disolviendo PEG en agua desionizada en la relación de un gramo de PEG a 1 mL de agua. La solución de PEG es entonces agregada a una solución de anticuerpo que está inicialmente a una concentración de menos de o igual a 0.5 mg/ml y un volumen de 0.5 mL. La solución de PEG se agrega continuamente y se mezcla hasta que persiste la primera muestra de turbiedad. El porcentaje de PEG 3000 necesario para causar esta precipitación se calcula como $50 \times (\text{volumen de solución de PEG 3000 agregada} / \text{volumen inicial de solución de anticuerpo antes de la adición de PEG})$.

El porcentaje de PEG 3000 necesario para la precipitación es comparado con el porcentaje necesario para la precipitación de proteína con solubilidad en agua conocida. Por ejemplo, la solubilidad en agua de adalimumab excede 200 mg/mL. En consecuencia, si el porcentaje de PEG 3000 requerido para precipitar una proteína de interés es similar al porcentaje necesario para precipitar adalimumab, entonces la solubilidad predicha de esa proteína será similar a la solubilidad del adalimumab.

Método de Solubilidad Real.

El método de la solubilidad real se determina usando filtros centrífugos Amicon para concentrar una proteína en solución hasta que se observa que la proteína se precipita de la solución o hasta que se alcanza el volumen mínimo al cual la proteína se puede concentrar dentro del filtro. Para lo último, 15 mL de filtros centrífugos Amicon tienen un volumen mínimo de aproximadamente 50 μ l mientras que 4 mL de filtros centrífugos Amicon tienen un volumen mínimo de aproximadamente 15 μ l.

Primero, una proteína es dializada en una(s) formulación(es) específica(s). Para estos estudios, la cantidad de anticuerpo para estos estudios, la cantidad de anticuerpo fue de 10 mg o mucho menos. Luego, la solución de proteína es insertada en la cámara de fracción retenida del filtro centrífugo. La cámara es recubierta con una membrana de nitrocelulosa con poros que permiten que moléculas de menos de 10 a 30 kilodaltons pasen cuando son sometidas a fuerza centrífuga. Los anticuerpos que están típicamente por encima de 140 kilodaltons serán retenidos mientras que el agua, moléculas amortiguadoras, excipientes pequeños y sales pasarán. El filtro centrífugo es entonces centrifugado de acuerdo con las especificaciones del fabricante hasta que se observa que la proteína se precipita de la solución o

hasta que se alcanza el volumen mínimo al cual la proteína puede ser concentrada en la unida de filtro.

Después de la centrifugación, la solución de proteína es removida de la cámara de fracción retenida y la concentración es medida mediante absorbancia ultravioleta. La solución es entonces mantenida a 25°C y 5°C por 1 a 2 días, y es monitoreada para señales de precipitación.

Técnica UV-CD Cercana.

La espectroscopía UV-CD cercana provee información importante acerca de la estructura terciaria de las proteínas y es una de las técnicas más usadas en este aspecto. CD se refiere a la absorción diferencial de los componentes polarizados circularmente izquierdo y derecho de la radiación de plano polarizado. Para las proteínas, los cromóforos en la región UVCD cercana (250 - 320 nm) son los amino ácidos aromáticos, p.e., triptófano, tirosina, y fenil-alanina, y los enlaces de disulfuro, y el efecto de CD ocurre cuando los cromóforos están presentes en un ambiente asimétrico (ocultos). Las señales en la región de 250-270 nm son atribuibles a residuos de fenilalanina, las señales de 270-290 nm son atribuibles a tirosina, y las de 280-300 nm son atribuibles a triptófano. Los enlaces de disulfuro dan lugar a señales amplias débiles en todo el espectro UV cercano. El espectro UV CD cercano puede ser sensible a pequeños cambios de la estructura terciaria tales como los debidos a las interacciones proteína-proteína y/o cambios de las condiciones de formulación.

Existen varios otros factores que pueden influenciar los espectros de CD de amino ácidos aromáticos. Entre estos están: (1) la rigidez de la proteína, (2) la naturaleza de la unión de hidrógeno, y (3) las interacciones entre varios amino ácidos aromáticos. Adicionalmente, las proteínas con gran número de

tales amino ácidos pueden tener bandas de CD más pequeñas debido a la cancelación de las bandas positiva y negativa.

Brevemente, una proteína dializada en la(s) formulación(es) deseada(s) a 1 mg/ml y es rastreada de 250-320 nm o 240-320 nm con un espectrómetro Jasco 800 CD. La formulación correspondiente sin proteína también es rastreada y las lecturas restadas de las del barrido de la solución de proteína. Un espectro de UV-CD cercano es una gráfica de las elipticidades molares versus la longitud de onda de 250 o 240 a 320 nm.

Para los anticuerpos en general, un espectro de UV-CD cercano con un perfil semi-sigmoidal indique buen plegamiento de estructura terciaria mientras que un perfil más plano y menos caracterizado indica una mayor tendencia a desplegamiento. El plegamiento compacto está asociado con buena estabilidad mientras que el plegamiento pobre expone el interior hidrofóbico lo cual puede conducir a interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de proteína produciendo la formación de agregados indeseables.

Técnica de DSC.

La estabilidad térmica de los anticuerpos se evaluó usando un instrumento de DSC. El instrumento DSC usado era un equipo VP-DSC automatizado con Celda Capilar (Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, UK). El desplegamiento de moléculas fue estudiado aplicando una velocidad de barrido de 1°C/minuto en un rango de temperatura de 25°C - 95°C para muestras a 1 mg/mL. Parámetros de medida adicionales aplicados fueron período de ajuste de 16 segundos, un tiempo de espera pre-barrido de 10 minutos, y las medidas se realizaron en un modo de no retroalimentación. Por medición individual, 420 µL de muestra/blanco se llenaron en el retenedor de muestra de medida del DSC, con un esquema de

llenado de placa proporcionado a continuación. Los termogramas obtenidos fueron ajustados a un modelo de dos estados para obtener las temperaturas de punto medio y las entalpías de las transiciones diferentes.

Un requerimiento adicional para el candidato de desarrollo de biología exitoso es que la proteína mantenga su estado y conformación nativos. Una proteína en solución acuosa está en equilibrio entre la conformación nativa (plegada) y su conformación desnaturalizada (desplegada). La estabilidad del estado nativo se basa en la magnitud de la energía libre de Gibbs (DG) del sistema y la relación termodinámica entre los cambios de entalpía (DH) y entropía (DS). Un cambio de DG positivo indica que el estado nativo es más estable que el estado desnaturalizado – entre más positivo DG, mayor es la estabilidad. Para que una proteína se despliegue se requiere que se rompan las fuerzas estabilizadoras. La entropía conformacional supera las fuerzas estabilizadoras permitiendo que la proteína se despliegue a temperaturas donde la entropía se vuelve dominante. La DSC mide la DH del desplegamiento de proteína debido a la desnaturalización térmica. Como una regla general, se puede afirmar que a mayor punto medio de transición (el T_m), es más estable la proteína a menores temperaturas. Durante el mismo experimento, la DSC también mide el cambio de capacidad calorífica (DCp) para la desnaturalización de proteína. Los cambios de capacidad calorífica asociados con el desplegamiento de proteína se deben principalmente a cambios de hidratación de las cadenas laterales que estaban ocultas en el estado nativo, pero se vuelven solventes expuestas en el estado desnaturalizado. Se ha mostrado que la DSC es un factor predictivo valioso de la estabilidad de formulación líquida para proteínas y otras macromoléculas biológicas (Remmele y Gombotz, *BioPharm.*, 13: 36-46 (2000), y Remmele et al., *Pharm. Res.*, 15: 200-208 (1998)).

Técnica SEC.

La cromatografía de exclusión de tamaño se usó para separar las proteínas con base en el tamaño. Las proteínas son transportadas en una fase móvil acuosa y a través de una resina de fase estacionaria porosa, empacadas en una columna. El tiempo de retención en la columna es una función del tamaño hidrodinámico de la proteína y el tamaño de los poros en el lecho de resina empacado. Las moléculas más pequeñas pueden penetrar en poros más pequeños en la resina y son retenidos más tiempo que las moléculas más grandes. A la elución de la columna, las proteínas son detectadas mediante absorbancia UV. El método SEC usó una protección de gel TSK (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, cat. no. 08543) y un gel TSK G3000SWxL (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, cat. no. 08541). La fase móvil fue Na_2HPO_4 100 mM, Na_2SO_4 200 mM, pH 6.8. La velocidad de flujo fue de 0.25 mL/minuto. El volumen de inyección fue de 20 μL de 1 mg/mL de muestra. La temperatura de la columna era temperatura ambiente. La temperatura del automuestreador era 2-8°C. El tiempo de corrida total fue de 55 minutos. La detección se basó en la absorbancia UV a longitud de onda de 214 nm, con ajuste de ancho de banda a 8 nm, usando longitud de onda de referencia a 360 nm con ancho de banda de 100 nm.

Método de Congelación-Descongelación.

Las soluciones de anticuerpo a 1 mg/ml en la(s) formulación(es) deseada(s) son congeladas a -80°C por al menos 4 horas y luego son descongeladas a 30°C en un baño de agua. La solución es entonces congelada de nuevo a -80°C. Esto se repite por 5 ciclos. Después de ciertos ciclos de congelación-descongelación, p.e., segundo y cuarto, una porción de la solución puede ser retirada para análisis mediante SEC antes de congelar de nuevo. La prueba de estabilidad de congelación-descongelación se hace a una

concentración de proteína baja con el fin de obtener un "escenario del pero caso" debido a la mayor exposición de las moléculas de proteína a las interfaces hielo-agua de desnaturalización. A mayores concentraciones, proporcionalmente menos proteína encuentra la interfaz hielo-agua, en lugar de interactuar con otras moléculas de proteína.

Método de Estabilidad Acelerada.

Las soluciones de anticuerpo a 1 mg/ml en la(s) formulación(es) deseada(s) son pasadas a través de filtros de PVDF de 0.22 μm bajo condiciones estériles e incubadas a 40°C y/o 50°C por al menos 21 días. En el día 7 y el día 21, se retiran alícuotas bajo condiciones estériles y se someten a análisis mediante SEC. Las soluciones son entonces devueltas a incubación.

Ejemplo 2: Generación y Aislamiento de los Anticuerpos Anti-DLL4 Monoclonales Humanos E9 y A10 mediante Tecnología de Despliegue de ARNm PROfusion.

Usando la tecnología de despliegue de ARNm PROfusion (ver, Chung-Ming Hsieh et al., Publicación de Solicitud de Patente Americana No. 2010/0099103), se seleccionaron librerías de anticuerpo de bazo humano y ganglio linfático recolectadas, siete rondas contra antígenos de DLL4: dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina 100 nM (ronda 1 y 2), una mezcla de dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina 50 nM, y dominio extracelular DLL4 de ratón marcado con biotina 50 nM (ronda 3), dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina 100 nM (ronda 4 y 5), células 293G que expresan establemente DLL4 humano y dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina 100 nM (ronda 6), células BAF3 que expresan establemente DLL4 humano y de ratón (ronda 7). Tanto A10 como E9 fueron identificados de la selección de librerías de anticuerpo de la ronda 7 (Tabla 4).

Cuando se construyeron en IgG1 humano tipo salvaje, fueron nombrados de nuevo A10.1 y E9.1, respectivamente.

Tabla 4. Información de Secuencia de los Clones E9 y A10 de Anticuerpo Anti-DLL4 Totalmente Humano PROfusion (Las CDRs enumeradas Kabat están indicadas mediante subrayado)

Clon	Fuente	Isotipo	Región V	Línea Germinal	Secuencia
					12345678901234567890
E9	Ganglio linfático Humano	hulgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH4-39	EVQLQESGPGGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSSSYWGWIR QPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARE DVILRGGSDYWGQGLVTVS S (SEQ ID NO:1)
			VL	V2-1	SYELTQPPSVSVSPGQTASI TCSGQRLGDKYASWYQQKPG QSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPM DEADYYCQAWDRDTGVFGYG TRVTVL (SEQ ID NO:111)
A10	Bazo Humano	hulgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH3-30	EVQLLESGGGLVKSGGSLRL SCAASGFTFRSHWMSWVRQA PGKGLEWVAIISYDGSNKYS ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQLNSLRAEDTAVYYCAKAG GGNVGFDIWGQGTMTVVS (SEQ ID NO:112)
			VL	V2-1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASI TCSADKLGTKYVSWYQQKPG QSPVLVIYQDAKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQTM DEADYLCQSWDRSDVVFSGG TKVTVL (SEQ ID NO:113)

Ejemplo 3: Caracterización In Vitro de Anticuerpos E9 y A10 PROfusion.

Se determinaron las afinidades de unión al antígeno DLL4 para E9 y A10 mediante la tecnología BIACORE descrita en el Ejemplo 1.1. Como se muestra

en la Tabla 5, siguiente, E9 y A10 tienen valores constantes de disociación en equilibrio similares contra DLL4 humano (K_D de 3.36 y 6.68 nM, respectivamente) y DLL4 de mono cynomolgus (K_D de 4.2 y 7.8 nM, respectivamente). E9 también reacciona cruzadamente con DLL4 de ratón y rata (K_D de 16 y 15 nM, respectivamente).

Tabla 5. Cinética Biacore sobre los Anticuerpos Anti-DLL4 PROfusion.

MAb	Cinética en Bioacore											
	ECD huDLL4			ECD cynoDLL4			ECD muDLL4			ECD ratDLL4		
	K_a	K_d	K_D	K_a	K_d	K_D	K_a	K_d	K_D	K_a	K_d	K_D
E9	2.0 E+04	6.6 E-05	3.36	1.8 E+04	7.4 E-05	4.2	1.8 E+04	2.6 E-04	16	1.9 E+04	2.9 E-04	15
A10	2.2 E+04	1.5 E-04	6.68	1.9 E+04	1.5 E-04	7.8	--	--	NB	--	--	NB

MAb = anticuerpo monoclonal; E = multiplica por 10 al exponente indicado; K_a ($M^{-1}s^{-1}$); K_d (s^{-1}); K_D (nM); NB = Sin unión (DLL4 900 nM)

También se evaluó la actividad de unión anticuerpo-antígeno usando ensayos basados en ELISA y FACS (descritos en el Ejemplo 1.2, 1.3 y los valores EC_{50} reportados en la Tabla 3). Además de la unión al dominio extracelular DLL4 recombinante (ECD), E9 y A10 pueden ambos unirse a DLL4 expresado en la superficie celular (Tabla 6).

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la interacción de DLL4 con su receptor Notch 1 con ensayos de competencia basados en ELISA y FACS descritos en el Ejemplo 1.4 y 1.5. Como se muestra en la Tabla 6, E9 y A10 bloqueó eficientemente la interacción la interacción de Notch1 con DLL4 (ECD y forma unida a célula). Adicionalmente, los ensayos funcionales basados en célula se desarrollaron para determinar adicionalmente la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la actividad celular mediada por

DLL4 *in vitro* (descrita en los Ejemplos 1.6 y 1.7). Tanto E9 como A10 inhibieron la activación de Notch inducido por DLL4 y la expresión de sVEGFR1 en células EA.hy926 (Tabla 6).

Tabla 6. Potencia *in vitro* del Anticuerpo DLL4 PROfusion.

	Ensayos de Unión Directa					Ensayos de Bloqueo Funcional							
MAb	ELISA de captura (EC ₅₀ , nM)			FACS (EC ₅₀ , nM)		ELISA de competencia (IC ₅₀ , nM)			FACS de competencia (IC ₅₀ , nM)		Inhibición de sVEGFR1 (IC ₅₀ , nM)		Inhibición de la activación Notch mediante células huDLL4, cocultivo (IC ₅₀ , nM)
	ECD DLL4			Células DLL4		DLL4 ECD/ huNotch-1			huNotch-1/ células DLL4		DLL4 ECD/ células EaHy		
	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu	
E9	0.17	0.18	0.40	7.23	0.32	1.7	2.1	2.1	23.4	3.2	1.0	0.4	6.2
A10	0.17	-	0.44	0.93	-	2.6	-	5.1	4.4	-	1.5	-	7.3

MAb = anticuerpo monoclonal; hu = humano; mu = murino; cyno = mono cynomolgus

Ejemplo 4: Maduración de Afinidad de los Anticuerpos PROfusion E9 y A10.

Maduración de Afinidad de E9 Anti-DLL4.

La alineación de secuencia mostró que el anticuerpo DLL4 E9 comparte la identidad más alta a líneas germinales humanas VH4-39/JH4 y V2-1/JL6. Para mejorar la afinidad de E9 a DLL4, se identificaron los residuos de CDR hipermutados de otras secuencias de anticuerpo humano en la base de datos IgBLAST que también compartían alta identidad a las líneas germinales VH4-39 y V2-1. Los residuos de CDR E9 correspondientes fueron entonces sometidos a mutagénesis limitada mediante PCR con cebadores que tienen baja generación en estas posiciones para crear tres librerías de anticuerpo en el formato scFv adecuado para uso en un procedimiento de maduración de afinidad. La primera librería contenía mutaciones en los residuos 30, 31, 32, 33, 50, 54, 56, y 65 en la VH CDR1 y 2 (numeración Kabat); la segunda librería en los residuos 95 a 100, 100a, 100b, 100c, y 102 en VH CDR3; y la tercera

librería en los residuos 27, 30, 31, 33, 52, 53, 93 a 96 en las tres VL CDRs. Para aumentar adicionalmente la identidad de E9 a las secuencias de marco de línea germinal humana, una Arg en la posición 103 de VL fue mutada a un Lys y también se introdujo una degeneración binaria en las posiciones 80 (A/P) y 100 (S/Y) de VL en la tercera librería (Tabla 7).

Tabla 7. Las mutaciones en las Secuencias de Amino Ácido de VH y VL E9 para Maduración de Afinidad.

Secuencia VH de E9 Mutada (SEQ ID NO:114)									
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTYY									
				NNGN		S		N	N
				G	NT	L		A	T
				R	G			I	G
				R				S	
								R	
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDYWGQGLTVTVSS									
N				E		YAMAYGGAA	D		
D						FSLPFS	SL	S	
G						QGPRMQ	V	N	
						WV	S	A	R
						LE	K		E
						AN	Q		R
						V			L
						G			P
						M			C
						E			I
									M
Secuencia VL de E9 Mutada (SEQ ID NO:115)									
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER									
				ES	E	V		Q	LT
				DG					TE
				M					AN
				K					EQ
				L					FS
				T					M
FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTRVTVL									
				A		SEVA	S	K	
						M	AC		
						E	S		
						N	M		
						K			

Estas librerías de E9 fueron transformadas en células y mostradas en superficies celulares a ser seleccionadas contra un dominio extracelular DLL4

biotinilado de baja concentración mediante clasificación celular magnética y luego activada por fluorescencia (FACS). Se realizó la selección de velocidad de asociación, velocidad de disociación o ambas mejoradas y se recuperaron las secuencias de proteína de anticuerpo de los clones E9 modulados por afinidad (Tabla 8) para convertirlos de nuevo al formato IgG para caracterización adicional.

Tabla 8. Secuencias de proteína de los clones de anticuerpo identificados de las librerías de maduración de afinidad para el Anticuerpo anti-DLL4 E9.

Clones Madurados de Afinidad: Regiones de Cadena Pesada (VH)			
E9.4	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYDVSLGGSSDH WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:116)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:117)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:118)	YDVSLGGSSDH (SEQ ID NO:119)
E9.11	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAVPLGGGSDY WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:120)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:121)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:122)	EAVPLGGGSDY (SEQ ID NO:123)
E9.14	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSRYHWGWIQSPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:124)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:125)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:126)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:127)
E9.17	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREEAILGGGSDY WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:128)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:129)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:130)	EEAILGGGSDY (SEQ ID NO:131)
E9.18	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIQPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:132)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:133)	DINYAGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:134)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:135)
E9.19	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARFDVSLGGGSDT WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:136)		

	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:137)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:138)	FDVSLGGGSDT (SEQ ID NO:139)
E9.22	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSRYHWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:140)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:141)	DIYYTGSTYYNPSLKG (SEQ ID NO:142)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:143)
E9.48	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY RGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:144)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:145)	DINYRGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:146)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:147)
E9.65	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRNSRYHWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:148)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:149)	DIYYTGSTYYNPSLKG (SEQ ID NO:150)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:151)
E9.66	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGVPLGGGADK WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:152)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:153)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:154)	EGVPLGGGADK (SEQ ID NO:155)
E9.71	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQALAMGGGSDK WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:156)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:157)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:158)	QALAMGGGSDK (SEQ ID NO:159)
E9.13	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:160)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:161)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:162)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:163)
E9.16	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:164)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:165)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:166)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:167)
E9.38	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY		

	TGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:168)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:169)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:170)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:171)
E9.2B	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSSNYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY NGNTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAVALGGGADD WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:172)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSNYWG (SEQ ID NO:173)	DINYNGNTYYNPSLKS (SEQ ID NO:174)	EAVALGGGADD (SEQ ID NO:175)
E9.1F	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAEAVSFGGGADS WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:176)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYWG (SEQ ID NO:177)	DINYIGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:178)	EAVSFGGGADS (SEQ ID NO:179)
E9.10H	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGNTYYNPSLKN RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREEVILGGGADQ WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:180)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:181)	DIYYTGNTYYNPSLKN (SEQ ID NO:182)	EEVILGGGADQ (SEQ ID NO:183)
E9.5E	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARESVPLGGGADE WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:184)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:185)	DINYIGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:186)	ESVPLGGGADE (SEQ ID NO:187)
E9.10C	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQAVMYGGGSDN WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:188)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYWG (SEQ ID NO:189)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:190)	QAVMYGGGSDN (SEQ ID NO:191)
E9.7E	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY AGSTYYNPSLKD RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDMILGGGADN WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:192)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:193)	DIYYAGSTYYNPSLKD (SEQ ID NO:194)	EDMILGGGADN (SEQ ID NO:195)
E9.12B	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSSNYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAEAVSFGGGADS WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:196)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSNYWG (SEQ ID NO:197)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:198)	EAVSFGGGADS (SEQ ID NO:199)

E9.10E	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSGNYYWGWIRQPPGKGLEWIGDISY TGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDMYGGGGDS WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:200)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGNYYWG (SEQ ID NO:201)	DISYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:202)	EDVMYGGGGDS (SEQ ID NO:203)
E9.6A	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKN RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAVLGGGADS WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:204)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:205)	DINYAGSTYYNPSLKN (SEQ ID NO:206)	EAVLGGGADS (SEQ ID NO:207)
E9.7A	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVKFGGGADL WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:208)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:209)	DINYAGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:210)	EDVKFGGGADL (SEQ ID NO:211)
E9.8H	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKN RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARESVPLGGGADN WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:212)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYWG (SEQ ID NO:213)	DIYYTGSTYYNPSLKN (SEQ ID NO:214)	ESVPLGGGADN (SEQ ID NO:215)
Clones Madurados de Afinidad: Regiones de Cadena Ligera (VL)			
E9.13	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDTLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:216)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDTLGDKYVS (SEQ ID NO:217)	EDSERPS (SEQ ID NO:218)	QAWDSETGV (SEQ ID NO:219)
E9.16	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGERLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDFKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDVGFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:220)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGERLGDKYVS (SEQ ID NO:221)	EDFKRPS (SEQ ID NO:222)	QAWDRDVG (SEQ ID NO:223)
E9.38	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDVGFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:224)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYVS (SEQ ID NO:225)	EDSKRPS (SEQ ID NO:226)	QAWDRDVG (SEQ ID NO:227)
E9.4	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS		

	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:228)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:229)	EDSKRPS (SEQ ID NO:230)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:231)
E9.11	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:232)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:233)	EDSKRPS (SEQ ID NO:234)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:235)
E9.14	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:236)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:237)	EDSKRPS (SEQ ID NO:238)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:239)
E9.17	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:240)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:241)	EDSKRPS (SEQ ID NO:242)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:243)
E9.18	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:244)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:245)	EDSKRPS (SEQ ID NO:246)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:247)
E9.19	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:248)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:249)	EDSKRPS (SEQ ID NO:250)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:251)
E9.22	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:252)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:253)	EDSKRPS (SEQ ID NO:254)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:255)
E9.48	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:256)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:257)	EDSKRPS (SEQ ID NO:258)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:259)

E9.65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 260)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 261)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 262)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 263)
E9.66	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 264)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 265)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 266)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 267)
E9.71	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 268)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 269)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 270)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 271)
E9.2B	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEGLDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSTRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 272)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLDKYVS (SEQ ID NO: 273)	EDSTRPS (SEQ ID NO: 274)	QAWDSETGV (SEQ ID NO: 275)
E9.1F	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDMEAGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 276)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (SEQ ID NO: 277)	EDSQRPSS (SEQ ID NO: 278)	QAWDMEAGV (SEQ ID NO: 279)
E9.10 C	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDSLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVT (SEQ ID NO: 280)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDSLGDKYVS (SEQ ID NO: 281)	EDSERPS (SEQ ID NO: 282)	QAWDSETGV (SEQ ID NO: 283)
E9.10 E	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEGLDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSEAGVFGSGTKVT (SEQ ID NO: 284)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLDKYVS (SEQ ID NO: 285)	EDSERPS (SEQ ID NO: 286)	QAWDSEAGV (SEQ ID NO: 287)
E9.7E	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSEAGVFGSGTKVT (SEQ ID NO: 288)		

	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (SEQ ID NO:289)	EDSERPS (SEQ ID NO:290)	QAWDSEAGV (SEQ ID NO:291)
E9.5E	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDMLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:292)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDMLGDKYVS (SEQ ID NO:293)	EDSQRPS (SEQ ID NO:294)	QAWDSETGV (SEQ ID NO:295)
E9.12 B	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSTRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSESGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:296)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDGLGDKYVS (SEQ ID NO:297)	EDSTRPS (SEQ ID NO:298)	QAWDSESGV (SEQ ID NO:299)
E9.10 H	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGESLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDGETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:300)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGESLGDKYVS (SEQ ID NO:301)	EDSKRPS (SEQ ID NO:302)	QAWDGETGV (SEQ ID NO:303)
E9.6A	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDMLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDTNRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:304)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDMLGDKYVS (SEQ ID NO:305)	EDTNRPS (SEQ ID NO:306)	QAWDSETGV (SEQ ID NO:307)
E9.7A	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGESLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYQDAMRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDMETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:308)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGESLGDKYVS (SEQ ID NO:309)	QDAMRPS (SEQ ID NO:310)	QAWDMETGV (SEQ ID NO:311)
E9.8H	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGESLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSMRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSEVGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:312)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGESLGDKYVS (SEQ ID NO:313)	EDSMRPS (SEQ ID NO:314)	QAWDSEVGV (SEQ ID NO:315)

Maduración de Afinidad de A10 Anti-DLL4.

De una manera similar a la maduración de afinidad de E9 descrita anteriormente, la alineación de secuencia mostró que el anticuerpo DLL4 A10 compartió la identidad más alta a líneas germinales humanas VH3-30 y V2-1. Las secuencias VH y VL humanas de VH3-30 y V2-1, respectivamente, fueron descargadas de la base de datos NCBI IgBlast para generar logos de secuencia. Estos logos de secuencia se usaron para decidir cuales posiciones serían dopadas para generar las librerías maduras de afinidad.

Las librerías de A10 fueron transformadas en células y mostradas en la superficie celular a ser seleccionada contra dominio extracelular DLL4 biotinilado de baja concentración mediante clasificación celular magnética y luego activada por fluorescencia. Se realizó la selección de velocidad de asociación o velocidad de disociación, o ambas, mejoradas y se recuperaron las secuencias de proteína de anticuerpo de los clones A10 modulados por afinidad, para convertirlos de nuevo al formato IgG para caracterización adicional. Las regiones de cadena pesada (VH) de los clones madurados de afinidad se muestran a continuación en la Tabla 9 y las regiones de cadena ligera (VL) de los clones madurados de afinidad se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 9. Regiones de Cadena Pesada Variable (VH) de los Clones A10 Madurados de Afinidad.

Región de Proteína		Secuencia	
		123456789012345678901234567890	
A10.3 VH			EVQLVESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR SHWMS WVRQAPGKGLEWVA IISYDGSNKYS ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCA KAGG GNVG F DIWGOGTMVTVSS (SEQ ID NO:316)
A10.3 VH	CDR-H1	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.:316	SHWMS
A10.3 VH	CDR-H2	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.:316	IISYDGSNKYSADSVKG
A10.3 VH	CDR-H3	Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.:316	AGG GNVG F DI
A10.K30 VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMS WVRQAPGKGLEWVAD DISSDGRYKYY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCA KAGG GNVG F DIWGOGTMVTVSS (SEQ ID NO:317)
A10.K30 VH	CDR-H1	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.:317	NHWMS
A10.K30 VH	CDR-H2	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.:317	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.K30 VH	CDR-H3	Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.:317	AGG GNVG F DI
A10.K42 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQ SHWMS WVRQAPGKGLEWV AMISYDGTIKYY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCA KAGG GNVG F DIWGOGTMVTVSS (SEQ ID NO:318)
A10.K42 VH	CDR-H1	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.:318	SHWMS
A10.K42 VH	CDR-H2	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.:318	MISYDGTIKYYADSVKG

Región de Proteína		Secuencia	
		123456789012345678901234567890	
A10.K42 VH	CDR-H3	Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.:318	AGGGNVGFDI
A10.9A VH			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFR SYWMSWVRQAPGKGLEWVATISYDGRNKDY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNL SLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:319)
A10.9A VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 319	SYWMS
A10.9A VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.:319	TISYDGRNKDYADSVKG
A10.9A VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 319	AGGGNVGFDI
A10.8A VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNL SLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:320)
A10.8A VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 320	NHWMS
A10.8A VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.:320	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.8A VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 320	AGGGNVGFDI
A10.1A VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFH SHWMSWVRQAPGKGLEWVAMISDDGRNKDY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNL SLRAED TAVYYCARAAGGNVGGLDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:321)
A10.1A VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 321	SHWMS
A10.1A VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.: 321	MISDDGRNKDYADSVKG
A10.1A VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 321	AAGGNVGGLDI
A10.5D VH			EVQLVESGGGVVQSGGSLRLSCAASGFTFG SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISVDGSNKYS ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCARAAGGNVGGLDSWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:322)
A10.5D VH		Residuos : 31- 35 de SEQ ID NO.: 322	SHWMS
A10.5D VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.: 322	DISVDGSNKYSADSVKG

Región de Proteína			Secuencia
			123456789012345678901234567890
A10.5D VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 322	AAGGNVGLDS
A10.3A VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:323)
A10.3A VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 323	NHWMS
A10.3A VH		Residuos 50- 66 of SEQ ID NO.: 323	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.3A VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 323	AGGGNVGFDI
A10.6B VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:324)
A10.6B VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 324	NHWMS
A10.6B VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.: 324	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.6B VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 324	AGGGNVGFDI
A10.3D VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFR SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISQDGSYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:325)
A10.3D VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 325	SHWMS
A10.3D VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.: 325	DISQDGSYKYYADSVKG
A10.3D VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 325	AAGGNVGFDI
A10.4C VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISNDGRYAYS ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAKAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:326)
A10.4C VH		Residuos 31- 35 de SEQ ID NO.: 326	SHWMS
A10.4C VH		Residuos 50- 66 de SEQ ID NO.: 326	DISNDGRYAYSADSVKG

Región de Proteína		Secuencia	
		123456789012345678901234567890	
A10.4C VH		Residuos 99 - 108 de SEQ ID NO.: 326	AGGGNVGFDI

Tabla 10. Regiones de Cadena Ligera Variable (VL) de Clones A10 Madurados de Afinidad.

Región de Proteína		Secuencia	
		123456789012345678901234567890	
A10.3 VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADKLGTK YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDAKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLCQSW DRSDVVFEGGGTKLTVL (SEQ ID NO:327)
A10.3 VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 327	SADKLGTKYVS
A10.3 VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 327	QDAKRPS
A10.3 VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 327	QSWDRSDVV
A10.L45 VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADELGTQ YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDATRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DRSGVVFEGGGTKLTVL (SEQ ID NO:328)
A10.L45 VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 328	SADELGTQYVS
A10.L45 VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 328	QDATRPS
A10.L45 VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 328	QAWDRSGVV
A10.L73 VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGSQ YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDAQRPSPGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DRSGVVFEGGGTKLTVL (SEQ ID NO:329)
A10.L73 VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 329	SGDNLGSQYVS
A10.L73 VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 329	QDAQRPS
A10.L73 VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 329	QAWDRSGVV
A10.3A VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADNLGEK YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDATRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSW DSSGAVFEGGGTKLTVL (SEQ ID NO:330)
A10.3A VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 330	SADNLGEKYVS

Región de Proteína		Secuencia	
			123456789012345678901234567890
A10.3A VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 330	QDATRPS
A10.3A VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 330	QSWDSSGAV
A10.6B VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SADNLGNQ YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDGMRPS GIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAW DWSGEV FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:331)
A10.6B VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 331	SADNLGNQYVS
A10.6B VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 331	QDGMRPS
A10.6B VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 331	QAWDWSGEV
A10.3D VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SADKLGTK YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDGNRPS GIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QSW DQSGAV FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:332)
A10.3D VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 332	SADKLGTKYVS
A10.3D VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 332	QDGNRPS
A10.3D VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 332	QSWDQSGAV
A10.4C VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SADNLGNQ YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDGMRPS GIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAW DSSGAV FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:333)
A10.4C VL	CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.: 333	SADNLGNQYVS
A10.4C VL	CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.: 333	QDGMRPS
A10.4C VL	CDR-L3	Residuos 88 - 96 de SEQ ID NO.: 333	QAWDSSGAV

Ejemplo 5: Construcción de Anticuerpos E9 de CDR Injertada.

Las CDRs de VH de E9 fueron injertadas en marco de consenso VH3 (VH injertada = E9vh3g2) y las CDRs de VL de E9 fueron injertadas en marco VL2-1 de anticuerpo anti-DLL4 A10 (VL injertada = E9a10vlg2) y en marco VK de línea germinal de A10 (la línea germinal de homología más cercana al VL de E9) (VL injertada = E9AVK). Alternativamente, también se realizó la reparación del marco (FW) con VH de E9; su FW se mantuvo pero se reemplazaron los amino ácidos que pueden causar inestabilidad del anticuerpo, (VH reparada = E9VH4r2). Se incorporaron retromutaciones de marco tanto en el injerto de CDR como en la reparación de FW para mantener la estructura y funcionalidad del anticuerpo (Tabla 11 y Tabla 14).

Las CDRs de E9 también fueron injertadas en los marcos de los anticuerpos anti-IL-18 y anti-IL-12. Específicamente, las CDRs de VH de E9 fueron injertadas en marco VH5-51 de anti-IL-18 (VH injertada = E9VH325) y en marco VH2-70 de anti-IL-12 (VH injertada = E9VH1D4.1). Las CDRs de VL de E9 fueron injertadas en marco VK L2/L16 de anti-IL-12 (VL injertada = E9VL325) y en marco VK B3 de anti-IL-12 (VL injertada = E9VL1D4.1). Se incorporaron retromutaciones de marco en el injerto de CDR para mantener la estructura y funcionalidad del anticuerpo (Tabla 15 y Tabla 18).

Los anticuerpos de CDR injertada contruidos *in silico* descritos anteriormente fueron sintetizados directamente en el plásmido de elección mediante Biotecnología Blue Heron. La región pesada variable fue insertada en marco en un fragmento de ADNc que codifica para la región constante de IgG1 tipo salvaje que contiene dos mutaciones de amino ácido en la región bisagra. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., *J. Immunol*, 147: 2657 (1991)). La región de cadena ligera variable fue

insertada en marco con la región constante lambda humana y con la región constante kappa humana. A la recepción de los constructos sintetizados en Blue Heron, el ADN fue escalado y la secuencia confirmada. Las cadenas ligera y pesada de CDR injertada correctas correspondientes para cada anticuerpo (Tablas 11 y 14) (Tablas 15 y 18) fueron co-transfectadas en células HEK-293-6E para producir transitoriamente anticuerpos anti-DLL4 humano de CDR injertada y longitud total. La Tabla 11 resume todos los variantes de anticuerpo E9 generados y los datos de expresión de HEK-293-6e. Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpo humano recombinante fueron purificados mediante cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido eluido mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos fueron dializados en PBS.

Se determinó la capacidad de los anticuerpos de CDR injertada purificados para unirse a DLL4 o para inhibir la actividad de DLL4 usando diferentes tipos de ensayo como ELISA (Ejemplo 1.2, Método 2), Biacore (Ejemplo 1.2) y Citometría de Flujo (FACS) (Ejemplo 1.3). La Tabla 12 y Tabla 16 muestran los valores de EC50 de los ensayos de ELISA y los ensayos FACS y se determinó la afinidad mediante Biacore de los anticuerpos de CDR injertada descritos respectivamente en la Tabla 11 y Tabla 15 para DLL4 humano, DLL4 murino y DLL4 cynomolgus. La Tabla 13 y Tabla 17 muestran los valores de IC50 de la ELISA de bloqueo (Ejemplo 1.4) y FACS de bloqueo (Ejemplo 1.5) con DLL4 humano y DLL4 murino para los anticuerpos de CDR injertada descritos respectivamente en la Tabla 11 y Tabla 15.

Tabla 11. Resumen de los variantes de anticuerpo E9 generados y datos de expresión

Anticuerpo	Nombre de VH	Nombre de VL	título de HEK-293-6e (mg/L)
E9-SE1	E9vh3g2	E9al0vlg2	104
E9-SE2	E9vh3g2	E9.1	87

E9-SE3	E9vh4r2	E9.1	89
E9-SE4	E9.1	E9a10vlg2	66
E9-SE5	E9.1	E9AVK	79
E9-SE6	E9vh4r2	E9a10vlg2	125
E9-SE7	E9vh3g2	E9AVK	56
E9-SE8	E9vh4r2	E9AVK	85

Tabla 12. Afinidades de Unión de los variantes del anticuerpo E9 para DLL4 humano, de ratón, y cynomolgus determinada mediante ELISA, Biacore, y FACS.

Datos de Unión								
Anticuerpo	DLL4 Humano			DLL4 de ratón			DLL4 Cyno	
	ELISA de unión (EC50, nM)	Biacore (Kd, nM)	FACS de unión (Kd, nM)	ELISA de unión (EC50, nM)	Biacore (Kd, nM)	FACS de unión (Kd, nM)	ELISA de unión (EC50, nM)	Biacore (Kd, nM)
E9-SE1	0.16	15.2*	3.45	0.19	12.83	1.34	0.14	5.42
E9-SE2	0.18	2.43	5.2	0.20	15.09	0.87	0.14	3.68
E9-SE3	0.18	2.26	2.29	0.20	12.1	0.74	0.14	3.42
E9-SE4	0.17	2.38	nc	0.20	10.52	1.15	0.14	3.92
E9-SE5	0.16	1.57	7.81	0.19	12.77	2.9	0.13	6.7
E9-SE6	0.17	0.64	4.25	0.19	10.04	1.18	0.13	6.55
E9-SE7	0.17	1.69	2.28	0.17	16.22	2.24	0.12	7.53
E9-SE8	0.18	2.00	2.67	0.19	13.03	2.32	0.14	3.41
E9.1	0.29	2.38	0.35	0.34	12.77	1.6*	0.24	4.08

*datos históricos; nc = no calculado

Tabla 13. Actividades neutralizantes de los variantes del anticuerpo E9 para DLL4 humano y de ratón determinadas mediante ELISA y FACS.

Functional Data				
Anticuerpo	DLL4 Humano		DLL4 de ratón	
	ELISA de Bloqueo (IC50, nM)	FACS de Bloqueo (IC50, nM)	ELISA de Bloqueo (IC50, nM)	FACS de Bloqueo (IC50, nM)
E9-SE1	2.7	8.51	2.9	1.71
E9-SE2	2.6	5.61	2.2	1.23
E9-SE3	2.5	6.75	2.1	1.25
E9-SE4	2.7	5.82	2.9	1.71
E9-SE5	2.6	6.38	2.4	1.76
E9-SE6	2.5	8.16	2.9	1.53
E9-SE7	2.4	7.81	2.4	1.94
E9-SE8	2.5	9.25	2.6	2.3
E9.1	2.5	4.55	2.5	1.02

Tabla 14. Secuencias de amino ácido de VH y VL de anticuerpos E9 de CDR injertada humanos.

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
334	VH E9.1		EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGLVTVS S
	VH E9.1 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:334	SSSYWG
	VH E9.1 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:334	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.1 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:334	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
335	VL E9.1		SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YAS WYQQKPGQSPVLVIY EDSKRPS GIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAW DRDTGV FGYGRVTVLG
	VL E9.1 CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.:335	SGQRLGDK YAS
	VL E9.1 CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.:335	EDSKRPS
	VL E9.1 CDR-L3	Residuos 88- 96 de SEQ ID NO.:335	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
336	VH E9-SE1		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNFYLQMNSLRAE DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGLVTVS S
	VH E9-SE1 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:336	SSSYWG
	VH E9-SE1 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:336	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE1 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:336	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
337	VL E9-SE1		LYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YAS WYQQKPGQSPVLVIY EDSKRPS GIPER FSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC QAW DRDTGV FGGGTKVTVLG

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE1 CDR-L1	Residuos 23-33 de SEQ ID NO.:337	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE1 CDR-L2	Residuos 49-55 de SEQ ID NO.:337	EDSKRPS
	VL E9-SE1 CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO.:337	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
338	VH E9-SE2		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS SSSYWG WIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLK SRVTISVDTSKNSFYLMNSLRAE DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGTLVTVS S
	VH E9-SE2 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.:338	SSSYWG
	VH E9-SE2 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.:338	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE2 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:338	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
339	VL E9-SE2		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAW DRDTGV FGYGTRVTVLG
	VL E9-SE2 CDR-L1	Residuos 23-33 de SEQ ID NO.:339	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE2 CDR-L2	Residuos 49-55 de SEQ ID NO.:339	EDSKRPS
	VL E9-SE2 CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO.:339	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
340	VH E9-SE3		EVQLQESGPGGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSSYWG WIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLK SRVTISVDTSKNQFYKLSSVRAE DTAVYYCARE EDVILRGGS DYWGQGTLVTVS S
	VH E9-SE3 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.:340	SSSYWG
	VH E9-SE3 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.:340	DIYYTGSTYYNPSLKS

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	VH E9-SE3 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:340	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
341	VL E9-SE3		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGQRLGDK YAS WYQQKPGQSPVLVIY EDSKRPS GIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAW DRDTGV VFGYGTRVTVLG
	VL E9-SE3 CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.:341	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE3 CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.:341	EDSKRPS
	VL E9-SE3 CDR-L3	Residuos 88- 96 de SEQ ID NO.:341	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
342	VH E9-SE4		EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGW IRQPPGKGLEWIG DIYYTGSTY YNPSLKS RVITISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTAVYYCARE EDVILRGGSDY WGQGTLVTVS S
	VH E9-SE4 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:342	SSSYWGW
	VH E9-SE4 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:342	DIYYTGSTY YNPSLKS
	VH E9-SE4 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:342	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
343	VL E9-SE4		LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC SGQRLGDK YAS WYQQKPGQSPVLVIY EDSKRPS GIPER FSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC QAW DRDTGV VFGGGTKVTVLG
	VL E9-SE4 CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.:343	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE4 CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.:343	EDSKRPS
	VL E9-SE4 CDR-L3	Residuos 88- 96 de SEQ ID NO.:343	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
344	VH E9-SE5		EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARE EDVILRGGSDY WGQGTLVTVS S
	VH E9-SE5 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:344	SSSYWG
	VH E9-SE5 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:344	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE5 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:344	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
345	VL E9-SE5		EYVLTQSPDFQSVPKEKVTITCS SGQRLGD KYAS WYQQKPDQSPKLVIEDSKRPSGVPS RFGSNGSGDDATLTINSLEAEDAATYYC QA WDRDTGV FQGQTKVEIKR
	VL E9-SE5 CDR-L1	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO.:345	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE5 CDR-L2	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO.:345	EDSKRPS
	VL E9-SE5 CDR-L3	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO.:345	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
346	VH E9-SE6		EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFYKLSSVRAE DTAVYYCARE EDVILRGGSDY WGQGTLVTVS S
	VH E9-SE6 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:346	SSSYWG
	VH E9-SE6 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:346	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE6 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:346	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
347	VL E9-SE6		LYVLTQPPSVSVSPGQTASITCS SGQRLGDK YAS WYQQKPGQSPVLVIY EDSKRPS GIPER FSGSNGSDTATLTISGTQTMDEADYLC QAW DRDTGV FGGGTKVTVLG

SEQ ID No.	Región de Proteína.		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE6 CDR-L1	Residuos 23-33 de SEQ ID NO.:347	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE6 CDR-L2	Residuos 49-55 de SEQ ID NO.:347	EDSKRPS
	VL E9-SE6 CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO.:347	QAWDRDTGV
348	VH E9-SE7		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVTISVDTSKNSFY LQMNSLRAE DTAVYYCAREDVILRGGS DYWGQGLTVTS S
	VH E9-SE7 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.:348	SSSYWG
	VH E9-SE7 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.:348	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE7 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:348	EDVILRGGS DY
349	VL E9-SE7		123456789012345678901234567890 EYVLTQSPDFQS VTPKEKVTITCSGQRLGD KYASWYQQKPDQSPKLV IYEDSKRPSGVPS RFGSGNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDTGVFGQGTKVEIKR
	VL E9-SE7 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:349	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE7 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:349	EDSKRPS
	VL E9-SE7 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:349	QAWDRDTGV
350	VH E9-SE8		123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVTISVDTSKNQFY LKLSSVRAE DTAVYYCAREDVILRGGS DYWGQGLTVTS S
	VH E9-SE8 CDR-H1	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.:350	SSSYWG
	VH E9-SE8 CDR-H2	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.:350	DIYYTGSTYYNPSLKS

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	VH E9-SE8 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:350	EDVILRGGSDY
351			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE8		EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSGQRLGDKYASWYQQKPDQSPKLVIIYEDSKRPSGVPSTRFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQAWDRDTGVFGQGTKVEIKR
	VL E9-SE8 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:351	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE8 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:351	EDSKRPS
	VL E9-SE8 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:351	QAWDRDTGV

Tabla 15. Resumen de los variantes de anticuerpo E9 generados y datos de expresión.

Nombre de VH	Nombre de VL	Título de HEK-293-6e (mg/L)
E9VH325	E9VL325	29
E9VH1D4.1	E9VL1D4.1	44

Tabla 16. Afinidades de unión de los anticuerpos E9 de CDR injertada para DLL4 humano, de ratón y cynomolgus determinadas mediante ELISA, Biacore y FACS.

Datos de Unión								
MAb	DLL4 Humano			DLL4 de ratón			DLL4 Cyno	
	ELISA de unión (EC50, nM)	Biacore (Kd, nM)	FACS de unión (Kd, nM)	ELISA de unión (EC50, nM)	Biacore (Kd, nM)	FACS de unión (Kd, nM)	ELISA de unión (EC50, nM)	Biacore (Kd, nM)
E9-FR1	0.11	0.72	4	0.13	1.6	2.51	0.12	0.74
E9-FR2	0.105	0.31	6.2	0.125	0.69	3.57	0.12	0.3
E9.1	0.03	0.52	3.62	0.04	1.1	1.66	0.035	0.47

Tabla 17. Actividades neutralizantes de los anticuerpos E9 de CDR injertada para DLL4 humano y de ratón determinadas mediante ELISA y FACS.

Datos Funcionales				
MAb	DLL4 Humano		DLL4 de ratón	
	ELISA de Bloqueo (IC50, nM)	FACS de Bloqueo (IC50, nM)	ELISA de Bloqueo (IC50, nM)	FACS de Bloqueo (IC50, nM)
E9-FR1	1.54	1.57	3.35	0.98
E9-FR2	1.52	3.03	4.35	1.07
E9.1	2.2	1.62	5.85	1.06

Tabla 18. Secuencias de amino ácido de VH y VL de anticuerpos E9 de CDR injertada humanos.

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
352	VH E9-FR1		EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS SSSYWGWIRQMPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSQVTISVDTSFNTEFLQWSSLKAS DTAMYYCAREDVILRGGSDYWGQGTMTVTS S
	VH E9-FR1 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:352	SSSYWG
	VH E9-FR1 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:352	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-FR1 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:352	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
353	VL E9-FR1		EYVLTQSPATLSVSPGERATLSCSGQRLGD KYASWYQQKPGQSPRLVIYEDSKRPSDIPA RFGSNGSGDEATLTISLQSEDAVYYCQA WDRDTGVFGQGTREIKR
	VL E9-FR1 CDR-L1	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO.:353	SGQRLGDKYAS
	VL E9-FR1 CDR-L2	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO.:353	EDSKRPS
	VL E9-FR1 CDR-L3	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO.:353	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
354	VH E9-FR2		EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKS RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPV DTATYYCAREDVILRGGSDYWGQGTITVTS S
	VH E9-FR2 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:354	SSSYWG
	VH E9-FR2 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:354	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-FR2 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:354	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
355	VL E9-FR2		DYVLTQSPDSLAVSLGERATINCSGQRLGD KYASWYQQKPGQSPKLVIIYEDSKRPSGIPD RFGSNGSGDDATLTISLQAEDVAVYYCQA WDRDTGVFGGGTKVEIKR

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	VL E9-FR2 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:355	SGQRLGDKYAS
	VL E9-FR2 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:355	EDSKRPS
	VL E9-FR2 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:355	QAWDRDTGV

Ejemplo 6: Diseño adicional del Anticuerpo E9-71 Madurado de Afinidad.

E9-71(M) y E9-71(L).

Tanto la cadena pesada como la cadena ligera del anticuerpo E9-71 anti-DLL4 madurado de afinidad fueron diseñados adicionalmente. La metionina (M) de la CDR-H3 de la cadena pesada de E9-71 fue mutada a leucina (L) mediante el diseño de cebadores delantero y reverso de superposición que contienen los nucleótidos mutados. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó en dos pasos secuenciales para amplificar el gen de región variable completo usando los dos cebadores que portan los nucleótidos mutados y dos cebadores extremos que contienen secuencias sobresalientes complementarias con el vector de recepción.

El péptido de señal usado para la cadena ligera de E9-71 (M) y E9-71 (L) se llama lambda 1 un péptido de señal. La región de marco 4 (F W4) hJL-1 de la cadena ligera de E9-71 se cambió a hJL2 para ser más compatible con la región constante huCL2 del anticuerpo. Los cebadores delantero y reverso fueron diseñados para contener nucleótidos mutados. Se llevó a cabo reacción en cadena de polimerasa (PCR) en dos pasos secuenciales para amplificar el gen de la región variable entera usando los dos cebadores que portan los

nucleótidos mutados y dos cebadores extremos que contienen secuencias sobresalientes complementarias al vector de recepción.

Los productos de PCR derivados de cada ensamble de ADNc fueron separados en un gel de agarosa y se extirpó y purificó la banda correspondiente al tamaño de ADNc de región variable predicha. La región pesada variable fue insertada en marco en un fragmento de ADNc que codifica para la región constante de IgG1 que contiene dos mutaciones de amino ácido de región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., *J. Immunol*, 147: 2657 (1991)). La región de cadena ligera variable fue insertada en marco entre el péptido de señal lambda 1a humano y la región constante lambda humana mediante recombinación homóloga. Las colonias bacterianas fueron aisladas y se extrajo el ADN plásmido; los insertos de ADNc fueron secuenciados en su totalidad. Las cadenas pesada y ligera correctas correspondientes a cada anticuerpo (Tabla 19) fueron co-transfectadas en células HEK-293-6E para producir transientemente los anticuerpos anti-DLL4 humano E9-71(M) o E9-71(L) de longitud total. Tanto E9.71(M) como E9.71(L) comparten la misma cadena ligera. Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpo humano recombinante pueden ser purificados mediante cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido eluído mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos fueron neutralizados y dializados en PBS.

Tabla 19. Secuencias de amino ácido VH y VL de anticuerpos E9.71 Humanos diseñados

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
356	VH E9.71		EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARQALAMGGGSDKWQGTLTVTS S
	VH E9.71 CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:356	SSSYWG
	VH E9.71 CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:356	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:356	QALAMGGGSDK
			123456789012345678901234567890
357	VL E9.71		SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGYGTKVTVLG
	VL E9.71 CDR-L1	Residuos 23- 33 de SEQ ID NO.:357	SGQRLGDKYAS
	VL E9.71 CDR-L2	Residuos 49- 55 de SEQ ID NO.:357	EDSKRPS
	VL E9.71 CDR-L3	Residuos 88- 96 de SEQ ID NO.:357	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
358	VH E9.71 (M)		EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARQALAMGGGSDKWQGTLTVTS S
	VH E9.71 (M) CDR-H1	Residuos 31- 37 de SEQ ID NO.:358	SSSYWG
	VH E9.71 (M) CDR-H2	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO.:358	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 (M) CDR-H3	Residuos 100-110 de SEQ ID NO.:358	QALAMGGGSDK
			123456789012345678901234567890

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
359	VL E9.71 (M)		SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGGGTKLTVLG
	VL E9.71 (M) CDR-L1	Residuos 23- 33 of SEQ ID NO.:359	SGQRLGDKYAS
	VL E9.71 (M) CDR-L2	Residuos 49- 55 of SEQ ID NO.:359	EDSKRPS
	VL E9.71 (M) CDR-L3	Residuos 88- 96 of SEQ ID NO.:359	QAWDRDTGV
360	VH E9.71 (L)		123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTAVYYCARQALALGGGSDKWGQGLTVTS S
	VH E9.71 (L) CDR-H1	Residuos 31- 37 of SEQ ID NO.:360	SSSYWGW
	VH E9.71 (L) CDR-H2	Residuos 52- 67 of SEQ ID NO.:360	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 (L) CDR-H3	Residuos 100-110 of SEQ ID NO.:360	QALALGGGSDK
361	VL E9.71 (L)		123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGGGTKLTVLG
	VL E9.71 (L) CDR-L1	Residuos 23- 33 of SEQ ID NO.:361	SGQRLGDKYAS
	VL E9.71 (L) CDR-L2	Residuos 49- 55 of SEQ ID NO.:361	EDSKRPS
	VL E9.71 (L) CDR-L3	Residuos 88- 96 of SEQ ID NO.:361	QAWDRDTGV

Ejemplo 7: Diseño del Péptido de señal E9-71(M).

Se usó el péptido de señal lambda 1a para la generación del anticuerpo anti-DLL4 E9-71(M). También se investigaron péptidos de señal alternativos. La predicción del porcentaje del clivado de anticuerpo correcto durante la expresión mamífera de secuencias de amino ácido construidas *in silico* de la región variable N-terminal E9-71(M) con diferentes péptidos de señal de las familias de péptidos de señal lambda y kappa es conocida en la técnica usando el Servidor Signal IP 3.0 disponible en la Internet (p.e., sitio Web cbs.dtu.dk/services/SignalIP/) o varios otros software equivalentes. Se eligieron los péptidos de señal con los porcentajes más altos de clivado correcto, uno de cada familia: el lambda 3p de la familia lambda y el L23 de la familia kappa. También se seleccionó una versión mutada del péptido de señal lambda 1a original, con dos cambios de amino ácido (glicina a arginina y serina a valina). Para la construcción de la cadena ligera que contiene el péptido de señal lambda 1a, se llevó a cabo reacción en cadena de polimerasa (PCR) en un paso para amplificar el gen de región variable entero usando dos cebadores extremos que contienen secuencias sobresalientes complementarias al vector de recepción con una de ellas que contiene la secuencia de nucleótido mutada. Para la construcción de la cadena ligera que contiene el péptido de señal lambda 3p y el péptido de señal kappa L23, se diseñados dos cebadores de superposición para construir la región de péptido de señal, luego se realizó reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar el gen de la región variable entero usando los dos cebadores extremos que contienen secuencias sobresalientes complementarias al vector de recepción. Se generaron dos versiones de las regiones variables de E9-71 usando los péptidos de señal lambda 3p y kappa L23: uno con la región variable de longitud total y otro faltante de la primera serina (S) en el N-terminal de región variable. Solamente se generó la región variable de longitud total con el péptido de señal lambda 1a. Los productos de PCR derivados de cada ensamble de ADNc fueron

separados en un gel de agarosa gel y se extirpó y purificó la banda correspondiente al tamaño del ADNc de región variable predicha. La región pesada variable fue insertada en marco en un fragmento de ADNc que codifica para la región constante de IgG1 que contiene dos mutaciones de amino ácido de región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., *J. Immunol*, 147: 2657 (1991)). La región de cadena ligera variable fue insertada en marco con la región constante lambda humana mediante recombinación homóloga. Las colonias bacterianas fueron aisladas, el AND plásmido extraído, y los insertos de ADNc fueron secuenciados en su totalidad. Las cadenas pesada y ligera correctas correspondientes a cada anticuerpo fueron co-transfectadas en células HEK-293-6E para producir transientemente anticuerpos anti-DLL4 humano E9-71(M) de longitud total. Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpo humano recombinante fueron purificados mediante Cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido eluido mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos fueron dializados en PBS. Los anticuerpos E9.71 (M) purificados fueron analizados mediante Espectrometría de Masas (MS) para confirmación de la secuencia de anticuerpo intacta. La Tabla 20, siguiente, muestra la secuencia de amino ácido de los diferentes péptidos de señal usados para la generación de E9.71(M). La Tabla 21, siguiente muestra los sitios de clivado de E9.71(M) analizados mediante Espectrometría de Masas.

Tabla 20. Secuencia de amino ácido de los péptidos de señal usados para la generación de E9.71(M)

Anticuerpo	Péptido de Señal	Secuencia del péptido de Señal	Región VL
E9.71(M)	λ 1a	MAWSPLFTLITHCAGSWA (SEQ ID NO:362)	Longitud Total
E9.71(M)-1	λ 1a (GS a RV)	MAWSPLFTLITHCARVWA	Longitud Total

		(SEQ ID NO:363)	
E9.71(M)-2	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCTVSEA (SEQ ID NO:364)	Longitud Total
E9.71(M)-3	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCTVSEA (SEQ ID NO:365)	S N-terminal faltante
E9.71(M)-4	Kappa L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (SEQ ID NO:366)	Longitud Total
E9.71(M)-5	Kappa L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (SEQ ID NO:367)	S N-terminal faltante

Tabla 21. Sitios de Clivado del Anticuerpo E9.71(M) analizados mediante Espectrometría de Masas (MS)

Anticuerpo	Sitio de Clivado Importante del Anticuerpo	% Pico Importante (↓)
E9.71(M)	MAWSPLFLT L ITHCAG↓SWA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:368)	95
E9.71(M)-1	MAWSPLFLT L ITHCARVWA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:369)	96
E9.71(M)-2	MAWTPLLLPLLTFCTVSEA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:370)	96
E9.71(M)-3	MAWTPLLLPLLTFCTVSEA↓YELTQPPSVS (SEQ ID NO:371)	97
E9.71(M)-4	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:372)	No Determinado
E9.71(M)-5	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC↓YELTQPPSVS (SEQ ID NO:373)	No Determinado

Ejemplo 8. Caracterización *In Vitro* de los Anticuerpos PROfusion Diseñados.

Se determinaron las afinidades de unión a antígeno de estos anticuerpos PROfusion diseñados mediante tecnología BIACORE descrito en el Ejemplo 1.1, y se muestran en la Tabla 22. Se evaluaron adicionalmente las actividades *in vitro* de los representativos usando los métodos descritos en el Ejemplo 1, con los resultados mostrados en la Tabla 23.

Tabla 22. Cinéticas de Biacore de los anticuerpos anti-DLL4 PROfusion diseñados.

	Cinéticas de Unión								
	ECD de DLL4 humano			ECD de DLL4 de Ratón			ECD de DLL4 Cyno		
Anticuerpo	K_a ($M^{-1}S^{-1}$) E+04	K_d (S^{-1}) E-05	K_D (nM)	K_a ($M^{-1}S^{-1}$) E+04	K_d (S^{-1}) E-05	K_D (nM)	K_a ($M^{-1}S^{-1}$) E+04	K_d (S^{-1}) E-05	K_D (nM)
E9.4	5.67	3.31	0.58	5.38	6.01	1.12	1.37	3.44	0.25
E9.11	3.63	1.74	0.48	2.77	1.39	0.5	5.31	0.89	0.17
E9.14	3.99	36.5	9.14	3.89	13.6	3.49	5.72	38.6	6.75
E9.17	4.39	0.44	0.1	3.7	1.41	0.38	7.51	1.23	0.16
E9.18	1.57	1.84	1.18	2.32	1.68	0.73	2.63	2.63	1

E9.19	7.49	5.17	0.69	6.7	20.6	3.07	1.92	4.86	0.25
E9.22	3.91	33.1	8.46	3.78	13.3	3.5	5.62	35.2	6.26
E9.48	1.1	7.59	6.92	1.65	4.17	2.53	1.68	7.91	4.71
E9.65	2.59	36.3	14	2.57	13.6	5.27	3.21	41.4	12.9
E9.66	3.26	0.25	0.078	2.89	1.44	0.50	6.55	0.91	0.14
E9.71	3.88	3.51	0.91	3.55	21.6	6.08	7.75	3.79	0.49
E9.13	3.74	4.97	1.33	4.34	21.2	4.89	7.92	4.95	0.63
E9.16	1.29	3.15	2.45	1.83	14.8	8.1	2.49	3.79	1.52
E9-38	1.27	3.48	2.75	1.84	17.1	9.27	2.42	3.47	1.44
E9.2B	35.6	0.79	0.02	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
E9.1F	21.8	1.16	0.05	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
E9-12B	15.1	0.31	0.02	8.35	1.47	0.18	N/D	N/D	N/D
E9-10H	10.4	5.9	0.57	6.53	2.23	0.34	N/D	N/D	N/D
E9-5E	15	0.6	0.04	8.9	0.2	0.02	N/D	N/D	N/D
E9-10C	12	4.59	0.38	7.37	12.1	1.6	N/D	N/D	N/D
E9-10E	21.8	4.62	0.21	15.1	9.41	0.62	N/D	N/D	N/D
E9-7E	15.2	4.12	0.27	9.53	22.1	2.3	N/D	N/D	N/D
A10.K30	3.57	27.4	7.69	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
A10.K42	10	40.6	4.06	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
A10.L45	4.4	3.16	0.72	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
A10.L73	5.07	0.95	0.19	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D

MAb = anticuerpo monoclonal; N/D = No determinado, NB = sin unión

Tabla 23. Caracterización del anticuerpo DLL4 PROfusion diseñado.

	Ensayos de Unión Directa					Ensayos de Bloqueo Funcional					
Anticuerpo	ESLISA de captura (EC ₅₀ , nM)			FACS (EC ₅₀ , nM)		ELISA de Competencia (IC ₅₀ , nM)			FACS de Competencia (IC ₅₀ nM)		Inhibición de la Actividad Notch mediante células huDLL4, cocultivo (IC ₅₀ nM)
	DLL4 ECD			DLL4 Cells		DLL4 ECD/ huNotch-1			huNotch-1/ DLL4 cells		
	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu	cyno	hu	mu	
E9-2B	0.16	0.16	0.45	1.78	0.35	2.3	2.8	2.2	2.63	0.34	2.1
E9-71	0.16	0.17	0.44	1.82	0.32	2.0	1.3	2.0	3.22	0.24	2.1

E9-19	0.17	0.17	0.46	2.79	0.54	1.8	1.3	1.5	4.90	0.44	4.4
E9-4	N/D	N/D	N/D	1.63	0.63	N/D	N/D	N/D	4.3	0.3	N/D
E9-11	N/D	N/D	N/D	4.46	1.45	N/D	N/D	N/D	14.75	2.06	N/D
E9-16	N/D	N/D	N/D	1.7	>50	N/D	N/D	N/D	12.6	1.1	N/D
E9-17	N/D	N/D	N/D	8	2.57	N/D	N/D	N/D	19.79	N/D	1
E9-22	N/D	N/D	N/D	34.34	37.35	N/D	N/D	N/D	21.05	2.63	N/D
E9-38	N/D	N/D	N/D	1.66	0.13	N/D	N/D	N/D	7.76	1.2	N/D
E9-48	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	9.12	1.3	N/D
E9-66	N/D	N/D	N/D	2.02	0.7	N/D	N/D	N/D	5.03	0.99	N/D
E9-1F	N/D	N/D	N/D	2.65	0.37	N/D	N/D	N/D	6.55	0.65	N/D
E9-5E	N/D	N/D	N/D	2.7	0.89	N/D	N/D	N/D	3.76	0.34	N/D
E9-7E	N/D	N/D	N/D	4.46	1.94	N/D	N/D	N/D	4	0.33	0.41
E9-10C	N/D	N/D	N/D	3.15	0.88	N/D	N/D	N/D	3.03	0.26	0.85
E9-10E	N/D	N/D	N/D	5.1	1.19	N/D	N/D	N/D	3.83	0.36	N/D
E9-10H	N/D	N/D	N/D	3.52	0.82	N/D	N/D	N/D	5.65	0.6	N/D
E9-12B	N/D	N/D	N/D	3.34	0.71	N/D	N/D	N/D	4.44	0.37	N/D
E9-71(M)	N/D	N/D	N/D	0.27	0.29	N/D	N/D	N/D	2.12	0.18	N/D
E9-71(L)	N/D	N/D	N/D	0.22	0.47	N/D	N/D	N/D	1.82	0.21	2.4
E9-71(M)-3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.65

hu = humano; mu = murino; cyno = mono cynomolgus; N/D = no determinada

Ejemplo 8: Propiedades Fisicoquímicas de los Anticuerpos PROfusion Seleccionados.

Se determinó la identidad de los anticuerpos monoclonales específicos para DLL4 mediante espectrometría de masas como se indica a continuación.

Análisis de Espectrometría de Masas de E9-71.

Análisis de peso molecular de cadena ligera y cadena pesada: La muestra de E9-71 se diluyó hasta 1 mg/mL con agua Milli-Q. Se agregó 1 μ L de DDT 1M a 20 μ L de muestra diluida. La muestra fue incubada a 37°C por 30 minutos. Se inyectó 1 μ L de las muestras reducidas en el sistema LC/MS Agilent 6510 Q-TOF con una columna de Difenilo Varian. El amortiguador A era ácido trifluoroacético al 0.02% (TFA), ácido fórmico al 0.08% (FA) en agua. El amortiguador B era TFA al 0.02%, FA al 0.08% en acetonitrilo. El gradiente inició a 5% de B, aumentó hasta 35% de B en 5 minutos, y aumentó hasta 38% de B en 15 minutos. El gradiente luego aumentó hasta 95% de B en 1 minuto y permaneció a 95% de B por 4 minutos, y disminuyó hasta 5% de B en 1 minuto. La velocidad de flujo fue de 50 μ L/min. El espectrómetro de masas estaba operado a voltaje de atomización de 5 kvoltios y el rango de barrido era de 600 a 3200 relación masa a carga. El peso molecular de cadena ligera de 22649 Dalton coincidió bien con el valor teórico estando el amino ácido Y en el N-terminal. Se observaron tres picos menores a pesos moleculares de 22014 Dalton, 22737 Dalton, y 22937 Dalton. El pico a 22014 Dalton era consistente con el fragmento de amino ácido 6 N-terminal. Este pico era causado más probablemente por la fragmentación en fuente de la cadena ligera de longitud total, porque el descenso del "valor de fragmentación" en el espectrómetro de masas puede conducir a la desaparición de este pico. 22737 Dalton era consistente con el valor teórico estando el amino ácido S en el N-terminal. 22937 Dalton era consistente con la cadena ligera con extensión de péptido de señal de los amino ácidos "LS" en el N-terminal. Los pesos moleculares de cadena pesada coincidieron bien con los valores teóricos. Los pesos moleculares observados fueron de 50263 Dalton, 50426 Dalton, y 50588 Dalton, con la diferencia correspondiente a 162 Dalton como resultado de glicosilación diferente.

Análisis de Espectrometría de Masas de E9-71(M).

Se usó el mismo método descrito en "Análisis de Espectrometría de Masas de E9-71" para analizar la muestra de E9-71(M). El peso molecular de la cadena ligera de 22645 Dalton coincidió bien con el valor teórico estando el amino ácido S en el N-terminal. Se observó un pequeño pico con peso molecular de 22989 Dalton, correspondiente a la cadena ligera con extensión de péptido de señal de los amino ácidos "SWA" en el N-terminal. También se observó un pico muy pequeño con peso molecular de 21923 Dalton, aunque este fue causado probablemente por la fragmentación en-fuente porque la disminución del "valor de fragmentación" del espectrómetro de masas condujo a la desaparición de este pico. Los pesos moleculares de cadena pesada coincidieron bien con los valores teóricos. Los pesos moleculares observados fueron de 50263 Dalton, 50426 Dalton, y 50588 Dalton, con la diferencia correspondiente a 162 Dalton como resultado de glicosilación diferente.

Análisis de Espectrometría de Masas de E9-71(L).

Se usó el mismo método descrito en "Análisis de espectrometría de masas de E9-71" para analizar la muestra E9-71 (L). El peso molecular de la cadena ligera de 22645 Dalton coincidió bien con el valor teórico estando el amino ácido S en el N-terminal. Se observó un pico pequeño con peso molecular de 22989 Dalton, correspondiente a la cadena ligera con extensión de péptido de señal de los amino ácidos "SWA" en el N-terminal. También se observó un pico muy pequeño con peso molecular de 21923 Dalton, aunque este fue causado probablemente por la fragmentación en-fuente porque la disminución del "valor de fragmentación" del espectrómetro de masas condujo a la desaparición de este pico. Los pesos moleculares de cadena pesada coincidieron bien con los valores teóricos. Los pesos moleculares observados

fueron de 50245 Dalton, 50407 Dalton, y 50569 Dalton, con la diferencia correspondiente a 162 Dalton como resultado de glicosilación diferente.

Análisis de Espectrometría de Masas de E9-71(M)-3.

Se usó el mismo método descrito en "Análisis de espectrometría de masas de E9-71" para analizar la muestra E9-71(M)-3. El peso molecular de la cadena ligera de 22558 Dalton coincidió bien con el valor teórico. También se observó un pico muy pequeño con peso molecular de 21923 Dalton, aunque este fue causado muy probablemente por la fragmentación en-fuente porque la disminución del "valor de fragmentación" del espectrómetro de masas condujo a la desaparición de este pico. Los pesos moleculares de cadena pesada coincidieron bien con los valores teóricos. Los pesos moleculares observados fueron de 50263 Dalton, 50426 Dalton, y 50588 Dalton, con la diferencia correspondiente a 162 Dalton como resultado de glicosilación diferente.

Se estimaron las solubilidades de los anticuerpos mediante precipitación en polietilen glicol (PEG) 3000. También se determinaron directamente, p.e., solubilidad real, concentrando los anticuerpos en una solución específica y/o amortiguador con filtros centrífugos Amicon y luego se observó la precipitación a 25°C y 5°C. Se infirió la estabilidad mediante ultra-violeta circular cercano (UV-CD) y calorimetría de barrido diferencial (DSC). Se evaluó la estabilidad al congelamiento y descongelamiento a temperaturas elevadas (estabilidad acelerada) mediante cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Las técnicas en detalle se describieron en el Ejemplo 1.8 y los resultados se describen a continuación:

Estimación de Solubilidad mediante Resultados de Precipitación en PEG.

Las Tablas 24 y 26 muestran el porcentaje de PEG 3000 necesario para inducir la precipitación de una serie de clones de E9. Los clones y la referencia Adalimumab fueron formulados a 0.2 mg/ml. De acuerdo con los resultados, se estima que clones tales como E9-4, E9-14, E9-22, y E9-19 tienen solubilidades similares a la del adalimumab (aproximadamente 200 mg/ml) mientras que se estima que clones tales como E9-11 y E9-17 tienen solubilidades mucho menores.

La Tabla 25 muestra el porcentaje de PEG 3000 necesario para inducir la precipitación para una serie de clones de E9 con estabilidad diseñada. Los clones y la referencia de adalimumab fueron formulados a 0.2 mg/ml. De acuerdo con los resultados, clones tales como E9-SE1 tienen las más altas solubilidades en la serie pero no se espera que tengan solubilidades similares a la del adalimumab (aproximadamente 200 mg/ml) mientras que se estima que clones tales como E9-SE5 tengan solubilidades mucho menores.

Tabla 24. Porcentaje de PEG 3000 necesario para inducir la precipitación para una serie de anticuerpos E9. (Los anticuerpos fueron formulados a 0.2 mg/ml.)

Número A	Lote #	Anticuerpo	% de PEG 3000
A-1242367.0	1718299	DLL4-E9-11 hIgG1/L	3.00
A-1242368.0	1718300	DLL4-E9-17 hIgG1/L	3.00
		E9.1 IgG2	3.00
A-1242369.0	1718301	DLL4-E9-18 hIgG1/L	4.00
A-1242370.0	1718302	DLL4-E9-48 hIgG1/L	4.00
		E9.1 IgG4	5.00
		DLL4-E9-3 hIgG/L	6.00
A-1242371.0	1718303	DLL4-E9-66 hIgG1/L	8.00
A-1241120.0	1716682	DLL4-E9-16 hIgG1/L	10.00
A-1242795.0	1718785	DLL4-E9-13 hIgG1/L	10.00
A-1241121.0	1716683	DLL4-E9-38 hIgG1/L	11.00
A-1242800.0	1718790	DLL4-E9-71 hIgG1/L	11.00
A-1242794.0	1718784	DLL4-E9-4 hIgG1/L	12.00
A-1242796.0	1718786	DLL4-E9-14 hIgG1/L	12.00
A-1242798.0	1718788	DLL4-E9-22 hIgG1/L	12.00

A-1242797.0	1718787	DLL4-E9-19 hIgG1/L	14.00
		adalimumab	14.00

Tabla 25. Porcentaje de PEG 3000 necesario para inducir la precipitación para una serie de anticuerpos E9 de estabilidad diseñada. (Los anticuerpos fueron formulados a 0.2 mg/ml.)

Anticuerpo	% de PEG 3000
E9-SE5	6.00
E9-SE7	7.00
E9-SE4	7.50
E9-SE8	7.50
E9-SE2	9.00
E9-SE3	9.00
E9-SE6	9.50
E9-SE1	10.00
(+) E9.1	9.00
(+) E9	10.50
adalimumab	13.00

Tabla 26. Porcentaje de PEG 3000 necesario para inducir la precipitación para una serie de anticuerpos E9. (Los anticuerpos fueron formulados a 0.2 mg/ml.)

Anticuerpo	% de PEG 3000
E9-2B	8.00
E9-1F	8.00
E9	10
adalimumab	14

Resultados de Selección de Solubilidad Real: E9, E9-19, E9-71, E9-2B, E9-1F.

Se obtuvieron soluciones que contienen 12 mg de E9, E9-71, E9-1F, y E9-19 y 5.5 mg de E9-2B. E9 es el isotipo mutante de IgG1. Los volúmenes de todas las soluciones fueron reducidos por debajo de 1 ml mediante ultracentrifugación con tubos de 15 ml Amicon 30K.

Después de este paso, se observó lo siguiente:
E9-2B y E9-19 eran claros. E9, E9-71, y E9-1F eran ligeramente turbios.

Se agregaron 10 ml de amortiguador de histidina 15 mM a pH 5.03 a cada tubo, y las soluciones fueron concentradas de nuevo hasta 1 ml. Las soluciones fueron entonces transferidas a tubos de 4 ml Amicon 30K y concentradas hasta el menor volumen posible.

Después de este paso, se observó lo siguiente a temperatura ambiente:
E9: 163 mg/ml; vol=0.05 ml; pH = 5.12
E9-19: 132 mg/ml; vol=0.05 ml; pH = 5.06
E9-71 : 193 mg/ml; vol=0.05 ml; pH = 5.32
E9-2B: 64 mg/ml; vol=0.1 ml; pH=5.29
E9-1F: 100 mg/ml; vol=0.1 ml; pH=5.31

Tanto E9-2B como E9-1F requirieron mucho más tiempo para concentrarse que los otros. Esto puede sugerir que su viscosidad es alta bajo las condiciones de formulación.

Las soluciones fueron entonces colocadas 5°C por dos días para evaluar la solubilidad a esta temperatura. Se observó lo siguiente:

E9: permaneció claro a 5°C y cuando retornó a temperatura ambiente.

E9-71: permaneció claro a 5°C y cuando retornó a temperatura ambiente

E9-1F: mostró una cantidad extremadamente ligera de turbiedad a 5°C que aclaró cuando retornó a temperatura ambiente después de 20 minutos

E9-2B: mostraron una ligera cantidad de turbiedad a 5°C que aclaró cuando se llevó hasta temperatura ambiente después de 20 minutos

E9-19: mostró turbiedad obvia a 5°C que aclaró cuando se llevó hasta temperatura ambiente después de 20 minutos.

Resultados de Selección de Solubilidad Real para E9-71.

Para E9-71, se concentraron 4 mg en solución con filtros centrífugos Amicon hasta 60 mg/ml. No se observó precipitación o turbiedad a 25°C ni después de almacenamiento por 1 día a 5°C.

Caracterización de la Estructura Terciaria por los Resultados UV-CD Cercano.

UV-CD cercano se realizó en muestras de E9, E9-19, E9-71, E9-2B, y E9-1F a 1 mg/ml. Los perfiles de los espectros mostraron un patrón sigmoidal observado típicamente por apropiadamente plegados. A partir de esta técnica, no se observa indicación de mal plegamiento para los anticuerpos.

Caracterización de Estabilidad Intrínseca mediante Calorimetría de Barrido diferencial (DSC).

Se realizó DSC en las muestras E9, E9-19, E9-71, E9-2B, y E9-1F a 1 mg/ml. Los resultados se dan en la Tabla 27. La aparición es la temperatura a la cual inicia el desplegamiento. También, un anticuerpo IgG muestra típicamente tres transiciones de desplegamiento (Tm): el desplegamiento del anticuerpo intacto está asociado con la fusión del dominio CH2 en el fragmento Fc, la fusión del dominio CH3 en el fragmento Fc, y fusión del fragmento Fab. Los valores de aparición sugieren que E9, E9-19, y E9-71 son los más estables. Típicamente, los clones con valores Tm mayores son preferidos sobre aquellos con menores valores.

Tabla 27. Estabilidad Intrínseca de los clones de E9 anti-DLL4 mediante DSC a 1 mg/ml.

Anticuerpo	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Aparición (°C)
E9	64.45	72.12	80.04	54
E9-19	65.66	77	---	56
E9-71	65.65	75.36	81.24	54
E9-2B	64.74	80.58	83.27	52.5
E9-1F	63.84	80.51	83.26	51.3

Evaluación de la Estabilidad a la Tensión de Congelación – Descongelación

Se evaluó la estabilidad a la Tensión de congelación – descongelación para las muestras de E9, E9-19, E9-71, E9-2B, y E9-1F a 1 mg/ml. La Tabla 28 muestra los resultados de los análisis de SEC de las muestras después de cinco ciclos de congelación-descongelación. Todos los anticuerpos evaluados eran estables a la tensión de congelación-descongelación. No se observó pérdida aparente de monómero incluso después de cinco ciclos de congelación – descongelación.

Tabla 28. Porcentaje de especies de monómero cuantificadas mediante SEC antes de congelación a -80⁰C y después de cinco ciclos de congelación a -80⁰C y descongelación a 30⁰C en baño de agua para los clones anti-DLL4.

Anticuerpo	% de monómero antes de congelación	% de monómero después del 5° ciclo de congelación-descongelación
E9	99.2	99.3
E9-19	99.3	99.1
E9-71	96.9	96.8
E9-2B	99.0	98.9
E9-1F	98.6	98.5

Evaluación de la Estabilidad a Temperaturas Elevadas (Estabilidad Acelerada).

Se evaluó la estabilidad a temperaturas elevadas para las muestras de E9, E9-19, E9-71, E9-2B, y E9-1F a 1 mg/ml. La Tabla 29 muestra los resultados de los análisis de SEC de muestras al tiempo cero y después de 7 y 21 días a 40⁰C y 50⁰C. La cinética de degradación para todos los anticuerpos reveló una reducción de aproximadamente 8% de porcentaje de monómero después de 21 días a 50⁰C.

Tabla 29. Porcentaje de diferentes especies cuantificado mediante SEC para clones anti-DLL4 en tiempo cero y después de incubación por 7 y 21 días a 40⁰C y 50⁰C. (Las muestras fueron formuladas a 1 mg/ml.)

Anticuerpo	% de monómero en tiempo cero	% de monómero a los 7 días a 40°C	% de monómero a los 7 días a 50°C	% de monómero a los 21 días a 40°C	% de monómero a los 21 días a 50°C
E9	99.2	98.6	86.8	90.9	88.1
E9-19	99.3	98.7	96.8	97.4	91.9
E9-71	96.9	96.4	95.4	95.0	91.0
E9-2B	99.0	98.6	97.0	97.1	92.4
E9-1F	98.6	98.2	96.5	96.8	91.9
Anticuerpo	% de agregado en tiempo cero	% de agregado a los 7 días a 40°C	% de agregado a los 7 días a 50°C	% de agregado a los 21 días a 40°C	% de agregado a los 21 días a 50 °C
E9	0.3	0.3	0.3	0.5	0.6
E9-19	0.3	0.3	0.4	0.7	1.4
E9-71	2.4	2.3	1.8	2.9	2.8
E9-2B	0.5	0.4	0.5	0.9	1.7
E9-1F	0.3	0.3	0.3	0.6	1.6
Anticuerpo	% de fragmento en tiempo cero	% de fragmento a los 7 días a 40°C	% de fragmento a los 7 días a 50°C	% de fragmento a los 21 días a 40°C	% de fragmento a los 21 días a 50°C
E9	0.5	1.2	12.9	8.7	11.3
E9-19	0.4	1.0	2.8	1.9	6.7
E9-71	0.7	1.3	2.8	2.1	6.2
E9-2B	0.6	1.0	2.5	2.0	5.9
E9-1F	1.1	1.5	3.2	2.5	6.5

Ejemplo 9: Evaluación de PK en Roedor de los Anticuerpos Anti-DLL4.

Lara evaluar las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos anti-DLL4, ratones SCID-Beige (n = 3 por anticuerpo) fueron administrados con una dosis única intraperitoneal (IP) de anticuerpo a una concentración de 5 o 30 mg/kg, dependiendo de la reactividad cruzada del anticuerpo al DLL4 murino. Se recolectaron muestras de suero longitudinales (5 µl de sangre entera diluida 1:50 en HBS-EP+ amortiguador por punto de tiempo) de cada animal durante 21 días. Se determinaron las concentraciones en suero usando una plataforma Biacore específica para DLL4. Brevemente, el DLL4 humano fue inmovilizado en un chip sensor y las muestras fueron inyectadas en una celda de flujo a 5 µl por minuto por 5 minutos midiendo y comparando con estándares los niveles

de unión resultantes. Se usaron los perfiles de tiempo a concentración para estimar los parámetros farmacocinéticos de $C_{\max}$ (concentración pico en suero), CL (depuración), y $t_{1/2}$ (vida media del anticuerpo), resumidos en la Tabla 30. Para ambos anticuerpos E9 y A10 PROfusion, se mejoraron sus propiedades farmacocinéticas mediante el diseño de CDR durante el proceso de maduración de afinidad.

Tabla 30. Parámetros farmacocinéticos de los anticuerpos anti-DLL4 en ratones SCID-beige.

Anticuerpo	Dosis (mg/kg)	C _{max} (µg/mL)	CL (mL/hr/kg)	t _{1/2} (d)
E9	30	201	3.10	1.3
E9-10C	30	165	0.82	5.2
E9-10E	30	263	0.97	3.8
E9-10H	30	235	1.49	3.1
E9-12B	30	146	1.32	3.8
E9-19	30	179	1.08	4.4
E9-1F	30	269	0.89	4.2
E9-2B	30	165	0.65	5.5
E9-5E	30	234	0.95	3.0
E9-66	30	114	2.90	1.9
E9-71	30	102	1.10	4.2
E9-71(L)	30	145	0.83	4.1
E9-71(M)	30	113	1.07	4.3
E9-7E	30	130	1.23	5.8
A10	5	10.5	5.80	3.1
A10.K30	5	15.6	0.69	17.7
A10.K42	5	12.5	0.93	13.8
A10.L45	5	18.6	0.65	13.4

Ejemplo 10: El Tratamiento con Anticuerpo Anti-DLL4 Aumentó la germinación Celular Endotelial *in vitro*

Se realizó el ensayo de germinación en perlas de gel de fibrina para examinar la actividad de angiogénesis *in vitro* de HUVEC (pasaje 2-3, Lonza) descrito (Nakatsu et al., *Microvasc. Res.*, 66: 102-112 (2003)). Brevemente, la

solución de fibrinógeno fue reconstituida con aprotinina (4 U/ml) y trombina (50 U/ml). Se recubrieron perlas Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech) con 350 a 400 HUVECs por perla durante la noche. Aproximadamente 20 perlas recubiertas con HUVEC fueron incrustadas en el coágulo de fibrina por pozo de una placa de cultivo tisular de 96 pozos. El medio acondicionado derivado de fibroblastos humanos normales (NHLF, Lonza) a confluencia del 80% fue plateado en la parte superior del gel. Se agregaron anticuerpo DLL4 y anticuerpo de control KLH a 15 µg/ml en el pozo. En el día 10 y 12, se tomaron imágenes con microscopio invertido y cámara Nikon CCD. La inhibición de DLL4 con los anticuerpos E9 y A10 produce potenciamiento de la germinación celular endotelial *in vitro* (datos no mostrados).

Ejemplo 11: El Tratamiento con Anticuerpo DLL4 Inhibió el Crecimiento de Tumor *in vivo*.

Se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-DLL4 sobre el crecimiento de tumor en xenoinjertos de tumor Calu-6 subcutáneos implantados en ratones SCID-Beige. Brevemente, se inocularon 2×10^6 células subcutáneamente en el costado de la pata derecha ratones SCID-Beige hembra. Se dejó que los tumores se establecieran por 14-18 días, punto en el cual se determinó el volumen de tumor usando mediciones de calibre electrónico. El tamaño del tumor se calculó usando la formula: $L \times W^2/2$. Los ratones fueron asignados en grupos de tratamiento (n=10 por grupo) de forma que la cohorte de animales tenía un volumen de tumor medio equivalente antes del inicio de la terapia (típicamente entre 180 y 250 mm³). Los animales fueron entonces dosificados intraperitonealmente dos veces por semana durante dos semanas (total de 4 dosis) con anticuerpos anti-DLL4. El volumen de tumor se midió en promedio dos veces por semana durante la duración del experimento hasta que el volumen medio de tumor en cada grupo alcanzó un punto final de $> 2,000 \text{ mm}^3$. Los resultados se muestran en la Tabla 31. Para la serie E9 de anticuerpos

PROfusion, aquellos con farmacocinética mejorada (como se muestra en el Ejemplo 9) tienden a tener actividad anti-tumor *in vivo* más fuerte.

Tabla 31. Eficacia de los anticuerpos anti-DLL4 en el modelo de xenoinjerto de tumor Calu-6 de cáncer pulmonar de célula no pequeña humana.

Tratamiento	Dosis, Ruta, Régimen	%T/C ^a	%ILS ^b
E9	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	43**	52**
E9-10C	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	26**	81**
E9-2B	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	28**	76**
E9-10E	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	30**	70**
E9-19	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	31**	64**
E9-5E	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	30**	57**
E9-71	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	34**	63**
E9-1F	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	34**	57**
E9-12B	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	38**	52**
E9-7E	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	38**	44**
E9-10H	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	41**	52**
E9-66	10 mg/kg IP, 2X/ semana X2	43**	32*

a. %T/C = volumen medio de tumor del grupo de tratamiento / volumen de tumor del grupo de control de tratamiento x 100. Los valores P (indicados por asteriscos) se derivan de la comparación de la prueba T se Student del grupo de tratamiento vs. el grupo de control de tratamiento. Con base en las mediciones del día 25/26/27.

b. %ILS = (T - C)/ C x 100, donde T = tiempo medio al punto final del grupo de tratamiento y C = tiempo medio al punto final del grupo de control de tratamiento. Los valores P (indicados por asteriscos) derivados de la

comparación del rango log de Kaplan Meier del grupo de tratamiento vs. grupo de control de tratamiento. Con base en un punto final de 2000 mm³.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo referencias de la literatura, patentes, solicitudes de patente y sitios web) que puedan ser citados a lo largo de esta solicitud están por medio de la presente incorporados mediante referencia en su totalidad para cualquier propósito, así como las referencias allí citadas.

Equivalentes

La invención puede estar incorporada en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. Las anteriores realizaciones están, por lo tanto, consideradas en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitantes de la invención aquí descrita. El alcance de la invención está, por ende, indicado mediante las reivindicaciones adjuntas en lugar de la descripción anterior, y todos los cambios que vengan dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones, pretenden, por consiguiente, estar aquí abarcados.

Los que se reivindica es:

1. una proteína de unión a DLL4 que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a DLL4 humano, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una o más CDRs seleccionadas del grupo que consiste de:

CDR-H1: X₁- X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ (SEQ ID NO:99), en donde;

X₁ es S o N;
 X₂ es S, G o N;
 X₃ es S, N, T, G o R;
 X₄ es Y;
 X₅ es Y o H;
 X₆ es W; y
 X₇ es G;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO: 100), en donde;

X₁ es D;
 X₂ es I;
 X₃ es Y, N, o S;
 X₄ es Y;
 X₅ es T, N, A, I, S o R;
 X₆ es G;
 X₇ es S, N, T o G;
 X₈ es T;
 X₉ es Y;
 X₁₀ es Y;
 X₁₁ es N;

X_{12} es P;
 X_{13} es S;
 X_{14} es L;
 X_{15} es K; y
 X_{16} es S, N, D o G;

CDR-H 3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 101), en donde;

X_1 es E, Y, F, Q, W, L, o A;
 X_2 es D, A, S, G, V, E o N;
 X_3 es V, M, L, P, o A;
 X_4 es I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M o E;
 X_5 es L, Y, F o M;
 X_6 es R, G, S, Q o A
 X_7 es G;
 X_8 es G, A o S;
 X_9 es S, A, L, V, R o G;
 X_{10} es D; y
 X_{11} es Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I M, T, Q, o K;

CDR-L1: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 102), en donde;

X_1 es S;
 X_2 es G;
 X_3 es Q, E o D;
 X_4 es R, S, G, M, K, L o T;
 X_5 es L;
 X_6 es G;
 X_7 es D o E;
 X_8 es K;
 X_9 es Y;
 X_{10} es A o V; y

X_{11} es S;

CDR-L2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 103), en donde;

X_1 es E o Q;

X_2 es D;

X_3 es S, L, T, A, E o F;

X_4 es K, T, E, N, Q, S, o M;

X_5 es R;

X_6 es P; y

X_7 es S;

y

CDR-L3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO: 104), en donde;

X_1 es Q;

X_2 es A;

X_3 es W;

X_4 es D;

X_5 es R, S, M, E, N, G, o K;

X_6 es D o E

X_7 es T, V, A, S o M;

X_8 es G, A o C; y

X_9 es V.

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

residuos 31-37 de SEQ ID NO:1 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:1 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:1 (CDR-H3);

residuos 23-33 de SEQ ID NO:111 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:111 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:111 (CDR-L3);

SEQ ID NO:117 (CDR-H1); SEQ ID NO:118 (CDR-H2); SEQ ID NO:119 (CDR-H3);

SEQ ID NO:121 (CDR-H1); SEQ ID NO:122 (CDR-H2); SEQ ID NO:123 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:125 (CDR-H1); SEQ ID NO:126 (CDR-H2); SEQ ID NO:127 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 129 (CDR-H1); SEQ ID NO:130 (CDR-H2); SEQ ID NO:131 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:133 (CDR-H1); SEQ ID NO:134 (CDR-H2); SEQ ID NO:135 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 137 (CDR-H1); SEQ ID NO:138 (CDR-H2); SEQ ID NO:139 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:141 (CDR-H1); SEQ ID NO:142 (CDR-H2); SEQ ID NO:143 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:145 (CDR-H1); SEQ ID NO:146 (CDR-H2); SEQ ID NO:147 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 149 (CDR-H1); SEQ ID NO:150 (CDR-H2); SEQ ID NO:151 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:153 (CDR-H1); SEQ ID NO:154 (CDR-H2); SEQ ID NO:155 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 157 (CDR-H1); SEQ ID NO:158 (CDR-H2); SEQ ID NO:159 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 161 (CDR-H1); SEQ ID NO:162 (CDR-H2); SEQ ID NO:163 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 165 (CDR-H1); SEQ ID NO:166 (CDR-H2); SEQ ID NO:167 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 169 (CDR-H1); SEQ ID NO:170 (CDR-H2); SEQ ID NO:171 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 173 (CDR-H1); SEQ ID NO:174 (CDR-H2); SEQ ID NO:175 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 177 (CDR-H1); SEQ ID NO:178 (CDR-H2); SEQ ID NO:179 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 181 (CDR-H1); SEQ ID NO:182 (CDR-H2); SEQ ID NO:183 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 185 (CDR-H1); SEQ ID NO:186 (CDR-H2); SEQ ID NO:187 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:189 (CDR-H1); SEQ ID NO:190 (CDR-H2); SEQ ID NO:191 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 193 (CDR-H1); SEQ ID NO:194 (CDR-H2); SEQ ID NO:195 (CDR-H3);
 SEQ ID NO: 197 (CDR-H1); SEQ ID NO:198 (CDR-H2); SEQ ID NO:199 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:201 (CDR-H1); SEQ ID NO:202 (CDR-H2); SEQ ID NO:203 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:205 (CDR-H1); SEQ ID NO:206 (CDR-H2); SEQ ID NO:207 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:209 (CDR-H1); SEQ ID NO:210 (CDR-H2); SEQ ID NO:211 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:213 (CDR-H1); SEQ ID NO:214 (CDR-H2); SEQ ID NO:215 (CDR-H3);
 SEQ ID NO:217 (CDR-L1); SEQ ID NO:218 (CDR-L2); SEQ ID NO:219 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:221 (CDR-L1); SEQ ID NO:222 (CDR-L2); SEQ ID NO:223 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:225 (CDR-L1); SEQ ID NO:226 (CDR-L2); SEQ ID NO:227 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:229 (CDR-L1); SEQ ID NO:230 (CDR-L2); SEQ ID NO:231 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:233 (CDR-L1); SEQ ID NO:234 (CDR-L2); SEQ ID NO:235 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:237 (CDR-L1); SEQ ID NO:238 (CDR-L2); SEQ ID NO:239 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:241 (CDR-L1); SEQ ID NO:242 (CDR-L2); SEQ ID NO:243 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:245 (CDR-L1); SEQ ID NO:246 (CDR-L2); SEQ ID NO:247 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:249 (CDR-L1); SEQ ID NO:250 (CDR-L2); SEQ ID NO:251 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:253 (CDR-L1); SEQ ID NO:254 (CDR-L2); SEQ ID NO:255 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:257 (CDR-L1); SEQ ID NO:258 (CDR-L2); SEQ ID NO:259 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:261 (CDR-L1); SEQ ID NO:262 (CDR-L2); SEQ ID NO:263 (CDR-L3);

SEQ ID NO:265 (CDR-L1); SEQ ID NO:266 (CDR-L2); SEQ ID NO:267 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:269 (CDR-L1); SEQ ID NO:270 (CDR-L2); SEQ ID NO:271 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:273 (CDR-L1); SEQ ID NO:274 (CDR-L2); SEQ ID NO:275 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:277 (CDR-L1); SEQ ID NO:278 (CDR-L2); SEQ ID NO:279 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:281 (CDR-L1); SEQ ID NO:282 (CDR-L2); SEQ ID NO:283 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:285 (CDR-L1); SEQ ID NO:286 (CDR-L2); SEQ ID NO:287 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:289 (CDR-L1); SEQ ID NO:290 (CDR-L2); SEQ ID NO:291 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:293 (CDR-L1); SEQ ID NO:294 (CDR-L2); SEQ ID NO:295 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:297 (CDR-L1); SEQ ID NO:298 (CDR-L2); SEQ ID NO:299 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:301 (CDR-L1); SEQ ID NO:302 (CDR-L2); SEQ ID NO:303 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:305 (CDR-L1); SEQ ID NO:306 (CDR-L2); SEQ ID NO:307 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:309 (CDR-L1); SEQ ID NO:310 (CDR-L2); SEQ ID NO:311 (CDR-L3);
 SEQ ID NO:313 (CDR-L1); SEQ ID NO:314 (CDR-L2); SEQ ID NO:315 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:334 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:334 (CDR-H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:334 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:335 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:335 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:335 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:336 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:336 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:336 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:337 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:337 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:337 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:338 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:338 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:338 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:339 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:339 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:339 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:340 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:340 (CDR-H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:340 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:341 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID
 NO:341 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:341 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:342 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID
 NO:342 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:342 (CDR-H3);

residuos 23-33 de SEQ ID NO:343 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:343 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:343 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:344 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:344 (CDR-H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:344 (CDR-H3);
 residuos 24-34 de SEQ ID NO:345 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:345 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:345 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:346 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:346 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:346 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:347 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:347 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:347 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:348 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:348 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:348 (CDR-H3);
 residuos 24-34 de SEQ ID NO:349 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:349 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:349 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:350 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:350 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:350 (CDR-H3);
 residuos 24-34 de SEQ ID NO:351 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:351 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:351 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:352 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:352 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:352 (CDR-H3);
 residuos 24-34 de SEQ ID NO:353 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:353 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:353 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:354 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:354 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:354 (CDR-H3);
 residuos 24-34 de SEQ ID NO:355 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:355 (CDR- L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:355 (CDR-L3);
 residuos 31-37 de SEQ ID NO:356 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:356 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:356 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:357 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:357 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:357 (CDR-L3);

residuos 31-37 de SEQ ID NO:358 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:358 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:358 (CDR-H3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:359 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:359 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:359 (CDR-L3); residuos 31-37 de SEQ ID NO:360 (CDR-H1); residuos 52-67 de SEQ ID NO:360 (CDR- H2); residuos 100-110 de SEQ ID NO:360 (CDR-H3); residuos 23-33 de SEQ ID NO:361 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:361 (CDR- L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:361 (CDR-L3)

3. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDRs.

4. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dichas al menos 3 CDRs comprenden un conjunto de CDR de dominio variable seleccionadas del grupo que consiste de:

Conjunto de CDR VH E9

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:1

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO: 1

CDR-H3 residuos 100-110 de SEQ ID NO:1

Conjunto de CDR VL E9

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:111

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:111

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO: 111

Conjunto de CDR VH E9.4

CDR-H1: SEQ ID NO:117

CDR-H2: SEQ ID NO:118

CDR-H3: SEQ ID NO:119

Conjunto de CDR VL E9.4

CDR-L1: SEQ ID NO:229

CDR-L2: SEQ ID NO:230

CDR-L3: SEQ ID NO:231

Conjunto de CDR VH E9.11

CDR-H1: SEQ ID NO: 121

CDR-H2: SEQ ID NO: 122

CDR-H3: SEQ ID NO:123

Conjunto de CDR VL E9.11

CDR-L1 : SEQ ID NO :233

CDR-L2: SEQ ID NO:234

CDR-L3: SEQ ID NO:235

Conjunto de CDR VH E9.14

CDR-H1: SEQ ID NO: 125

CDR-H2: SEQ ID NO:126

CDR-H3: SEQ ID NO:127

Conjunto de CDR VL E9.14

CDR-L1: SEQ ID NO:237

CDR-L2: SEQ ID NO:238

CDR-L3 : SEQ ID NO :239

Conjunto de CDR VH E9.17

CDR-H1: SEQ ID NO: 129

CDR-H2: SEQ ID NO: 130

CDR-H3: SEQ ID NO: 131

Conjunto de CDR VL E9.17

CDR-L1 : SEQ ID NO :241

CDR-L2: SEQ ID NO:242

CDR-L3: SEQ ID NO:243

Conjunto de CDR VH E9.18

CDR-H1: SEQ ID NO:133

CDR-H2: SEQ ID NO:134

CDR-H3: SEQ ID NO: 135

Conjunto de CDR VL E9.18

CDR-L1: SEQ ID NO:245

CDR-L2 : SEQ ID NO :246

CDR-L3 : SEQ ID NO :247

Conjunto de CDR VH E9.19

CDR-H1: SEQ ID NO:137

CDR-H2: SEQ ID NO: 138

CDR-H3: SEQ ID NO: 139

Conjunto de CDR VL E9.19

CDR-L1: SEQ ID NO:249

CDR-L2: SEQ ID NO:250

CDR-L3: SEQ ID NO:251

Conjunto de CDR VH E9.22

CDR-H1: SEQ ID NO:141

CDR-H2 : SEQ ID NO : 142

CDR-H3: SEQ ID NO:143

Conjunto de CDR VL E9.22

CDR-L1 : SEQ ID NO :253

CDR-L2: SEQ ID NO:254

CDR-L3 : SEQ ID NO :255

Conjunto de CDR VH E9.48

CDR-H1: SEQ ID NO: 145

CDR-H2: SEQ ID NO: 146

CDR-H3 : SEQ ID NO : 147

Conjunto de CDR VL E9.48

CDR-L1 : SEQ ID NO :257

CDR-L2: SEQ ID NO:258

CDR-L3: SEQ ID NO:259

Conjunto de CDR VH E9.65

CDR-H1: SEQ ID NO: 149

CDR-H2: SEQ ID NO:150

CDR-H3: SEQ ID NO: 151

Conjunto de CDR VL E9.65

CDR-L1 : SEQ ID NO :261

CDR-L2 : SEQ ID NO :262

CDR-L3: SEQ ID NO:263

Conjunto de CDR VH E9.66

CDR-H1: SEQ ID NO:153

CDR-H2: SEQ ID NO:154

CDR-H3: SEQ ID NO: 155

Conjunto de CDR VL E9.66

CDR-L1: SEQ ID NO:265

CDR-L2: SEQ ID NO:266

CDR-L3: SEQ ID NO:267

Conjunto de CDR VH E9.71

CDR-H1: SEQ ID NO:157

CDR-H2: SEQ ID NO:158

CDR-H3: SEQ ID NO: 159

Conjunto de CDR VL E9.71

CDR-L1 : SEQ ID NO :269

CDR-L2 : SEQ ID NO :270

CDR-L3: SEQ ID NO:271

Conjunto de CDR VH E9.13

CDR-H1: SEQ ID NO:161

CDR-H2 : SEQ ID NO : 162

CDR-H3 : SEQ ID NO : 163

Conjunto de CDR VL E9.13

CDR-L1: SEQ ID NO :217

CDR-L2: SEQ ID NO :218

CDR-L3 : SEQ ID NO :219

Conjunto de CDR VH E9.16

CDR-H1: SEQ ID NO:165

CDR-H2: SEQ ID NO: 166

CDR-H3: SEQ ID NO: 167

Conjunto de CDR VL E9.16

CDR-L 1 : SEQ ID NO :221

CDR-L2: SEQ ID NO:222

CDR-L3: SEQ ID NO:223

Conjunto de CDR VH E9.38

CDR-H1: SEQ ID NO: 169

CDR-H2 : SEQ ID NO : 170

CDR-H3: SEQ ID NO: 171

Conjunto de CDR VL E9.38

CDR-L1: SEQ ID NO:225

CDR-L2: SEQ ID NO:226

CDR-L3: SEQ ID NO:227

Conjunto de CDR VH E9.2B

CDR-H1: SEQ ID NO:173

CDR-H2: SEQ ID NO: 174

CDR-H3: SEQ ID NO: 175

Conjunto de CDR VL E9.2B

CDR-L1: SEQ ID NO:273

CDR-L2: SEQ ID NO:274

CDR-L3: SEQ ID NO:275

Conjunto de CDR VHE9.1F

CDR-H1: SEQ ID NO: 177

CDR-H2: SEQ D NO:178

CDR-H3: SEQ ID NO:179

Conjunto de CDR VLE9.1F

CDR-L1 : SEQ ID NO :277

CDR-L2: SEQ ID NO:278

CDR-L3 : SEQ ID NO :279

Conjunto de CDR VHE9.10H

CDR-H1: SEQ ID NO:181

CDR-H2: SEQ ID NO: 182

CDR-H3: SEQ ID NO:183

Conjunto de CDR VLE9.10H

CDR-L1: SEQ ID NO:301

CDR-L2: SEQ ID NO:302

CDR-L3: SEQ ID NO:303

Conjunto de CDR VH E9.5E

CDR-H1: SEQ ID NO: 185

CDR-H2: SEQ ID NO: 186

CDR-H3: SEQ ID NO:187

Conjunto de CDR VL E9.5E

CDR-L1: SEQ ID NO :293

CDR-L2: SEQ ID NO :294

CDR-L3: SEQ ID NO:295

Conjunto de CDR VHE9.10C

CDR-H1: SEQ ID NO: 189

CDR-H2: SEQ ID NO: 190

CDR-H3: SEQ ID NO: 191

Conjunto de CDR VLE9.10C

CDR-L1: SEQ ID NO:281

CDR-L2: SEQ ID NO:282

CDR-L3: SEQ ID NO:283

Conjunto de CDR VH E9.7E

CDR-H1: SEQ ID NO: 193

CDR-H2: SEQ ID NO: 194

CDR-H3: SEQ ID NO: 195

Conjunto de CDR VL E9.7E

CDR-L1: SEQ ID NO: 289

CDR-L2: SEQ ID NO: 290

CDR-L3: SEQ ID NO:291

Conjunto de CDR VHE9.12B

CDR-H1: SEQ ID NO: 197

CDR-H2: SEQ ID NO: 198

CDR-H3: SEQ ID NO: 199

Conjunto de CDR VL E9.12B

CDR-L1: SEQ ID NO:297

CDR-L2: SEQ ID NO:298

CDR-L3: SEQ ID NO :299

Conjunto de CDR VH E9.10E

CDR-H1: SEQ ID NO:201

CDR-H2: SEQ ID NO :202

CDR-H3: SEQ ID NO:203

Conjunto de CDR VLE9.10E

CDR-L1: SEQ ID NO:285

CDR-L2: SEQ ID NO:286

CDR-L3: SEQ ID NO:287

Conjunto de CDR VH E9.6A

CDR-H1: SEQ ID NO :205

CDR-H2: SEQ ID NO :206

CDR-H3: SEQ ID NO:207

Conjunto de CDR VL E9.6A

CDR-L1: SEQ ID NO:305

CDR-L2: SEQ ID NO:306

CDR-L3: SEQ ID NO:307

Conjunto de CDR VH E9.7A

CDR-H1: SEQ ID NO:209

CDR-H2: SEQ ID NO :210

CDR-H3: SEQ ID NO :211

Conjunto de CDR VL E9.7A

CDR-L1: SEQ ID NO:309

CDR-L2: SEQ ID NO:310

CDR-L3: SEQ ID NO:311

Conjunto de CDR VHE9.8H

CDR-H1: SEQ ID NO :213

CDR-H2: SEQ ID NO :214

CDR-H3: SEQ ID NO:215

Conjunto de CDR VL E9.8H

CDR-L1: SEQ ID NO:313

CDR-L2: SEQ ID NO:314

CDR-L3: SEQ ID NO:315

Conjunto de CDR VHE9.1

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:334

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:334

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:334

Conjunto de CDR VLE9.1

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:335

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:335

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:335

Conjunto de CDR VH E9-SE1

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:336

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:336

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:336

Conjunto de CDR VL E9-SE1

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:337

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:337

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:337

Conjunto de CDR VH E9-SE2

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:338

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:338

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:338

Conjunto de CDR VL E9-SE2

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:339

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:339

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:339

Conjunto de CDR VH E9-SE3

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:340

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:340

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:340

Conjunto de CDR VL E9-SE3

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:341

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:341

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:341

Conjunto de CDR VH E9-SE4

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:342

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:342

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:342

Conjunto de CDR VL E9-SE4

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:343

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:343

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:343

Conjunto de CDR VH E9-SE5

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:344

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:344

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:344

Conjunto de CDR VL E9-SE5

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:345

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:345

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:345

Conjunto de CDR VH E9-SE6

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:346

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:346

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:346

Conjunto de CDR VL E9-SE6

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:347

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:347

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:347

Conjunto de CDR VH E9-SE7

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:348

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:348

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:348

Conjunto de CDR VL E9-SE7

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:349

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:349

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:349

Conjunto de CDR VH E9-SE8

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:350

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:350

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:350

Conjunto de CDR VL E9-SE8

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:351

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:351

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:351

Conjunto de CDR VH E9-FR1

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:352

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:352

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:352

Conjunto de CDR VL E9-FR1

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:353

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:353

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:353

Conjunto de CDR VH E9-FR2

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:354

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:354

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:354

Conjunto de CDR VL E9-FR2

CDR-L1: residuos 24-34 de SEQ ID NO:355

CDR-L2: residuos 50-56 de SEQ ID NO:355

CDR-L3: residuos 89-97 de SEQ ID NO:355

Conjunto de CDR VH E9.71

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:356

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:356

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:356

Conjunto de CDR VL E9.71

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:357

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:357

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:357

Conjunto de CDR VH E9.71(M)

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:358

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:358

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:358

Conjunto de CDR VL E9.71 (M)

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:359

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:359

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:359

Conjunto de CDR VH E9.71(L)

CDR-H1: residuos 31-37 de SEQ ID NO:360

CDR-H2: residuos 52-67 de SEQ ID NO:360

CDR-H3: residuos 100-110 de SEQ ID NO:360

Conjunto de CDR VL E9.71(L)

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:361

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:361

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:361

5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.

6. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichos al menos dos conjuntos de CDR de domino variable se seleccionan de un grupo que consiste de:

Conjunto de CDR VH E9 y Conjunto de CDR VL E9,
 Conjunto de CDR VH E9.4 y Conjunto de CDR VL E9.4,
 Conjunto de CDR VH E9.11 y Conjunto de CDR VL E9.11,
 Conjunto de CDR VH E9.14 y Conjunto de CDR VL E9.14,
 Conjunto de CDR VH E9.17 y Conjunto de CDR VL E9.17,
 Conjunto de CDR VH E9.18 y Conjunto de CDR VL E9.18,
 Conjunto de CDR VH E9.19 y Conjunto de CDR VL E9.19,
 Conjunto de CDR VH E9.22 y Conjunto de CDR VL E9.22,
 Conjunto de CDR VH E9.48 y Conjunto de CDR VL E9.48,
 Conjunto de CDR VH E9.65 y Conjunto de CDR VL E9.65,
 Conjunto de CDR VH E9.66 y Conjunto de CDR VL E9.66,
 Conjunto de CDR VH E9.71 y Conjunto de CDR VL E9.71,
 Conjunto de CDR VH E9.13 y Conjunto de CDR VL E9.13,
 Conjunto de CDR VH E9.16 y Conjunto de CDR VL E9.16,
 Conjunto de CDR VH E9.38 y Conjunto de CDR VL E9.38,
 Conjunto de CDR VH E9.2B y Conjunto de CDR VL E9.2B,
 Conjunto de CDR VH E9.1F y Conjunto de CDR VL E9.1F,
 Conjunto de CDR VH E9.10H y Conjunto de CDR VL E9.10H,
 Conjunto de CDR VH E9.5E y Conjunto de CDR VL E9.5E,
 Conjunto de CDR VH E9.10C y Conjunto de CDR VL E9.10C,
 Conjunto de CDR VH E9.7E y Conjunto de CDR VL E9.7E,
 Conjunto de CDR VH E9.12B y Conjunto de CDR VL E9.12B,
 Conjunto de CDR VH E9.10E y Conjunto de CDR VL E9.10E,
 Conjunto de CDR VH E9.6A CDR y Conjunto de CDR VL E9.6A,
 Conjunto de CDR VH E9.7A CDR y Conjunto de CDR VL E9.7A,
 Conjunto de CDR VH E9.8H y Conjunto de CDR VL E9.8H,
 Conjunto de CDR VH E9-SE1 y Conjunto de CDR VL E9-SE1,

Conjunto de CDR VH E9-SE2 y Conjunto de CDR VL E9-SE2,
 Conjunto de CDR VH E9-SE3 y Conjunto de CDR VL E9-SE3,
 Conjunto de CDR VH E9-SE4 y Conjunto de CDR VL E9-SE4,
 Conjunto de CDR VH E9-SE5 y Conjunto de CDR VL E9-SE5,
 Conjunto de CDR VH E9-SE6 y Conjunto de CDR VL E9-SE6,
 Conjunto de CDR VH E9-SE7 y Conjunto de CDR VL E9-SE7,
 Conjunto de CDR VH E9-SE8 y Conjunto de CDR VL E9-SE8,
 Conjunto de CDR VH E9-FR1 y Conjunto de CDR VL E9-FR1,
 Conjunto de CDR VH E9-FR2 y Conjunto de CDR VL E9-FR2,
 Conjunto de CDR VH E9.71 y Conjunto de CDR VL E9.71,
 Conjunto de CDR VH E9.71(M) y Conjunto de CDR VL E9.71(M), y
 Conjunto de CDR VH E9.71(L) y Conjunto de CDR VL E9.71(L).

7. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, que comprende además un marco aceptor humano.

8. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

secuencias de marco aceptor de cadena pesada SEQ ID NOS:6-22,
 secuencias aceptoras de cadena pesada SEQ ID NOS:35-62,
 secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:23-34, y
 secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:63-98.

9. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7 o reivindicación 8, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor

humano y que comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

10. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco en un residuo clave, dicho residuo clave es seleccionado del grupo que consiste de:

- un residuo adyacente a una CDR;
- un residuo de sitio de glicosilación;
- un residuo raro;
- un residuo capaz de interactuar con DLL4 humano
- un residuo canónico;
- un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera;
- un residuo dentro de una zona Vernier; y
- un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada definida por Chothia y un marco de cadena pesada definida primero por Kabat.

11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el residuo clave se selecciona del grupo que consiste de: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L, 95L.

12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

13. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína de unión descrita anteriormente comprende al menos un dominio variable que tiene secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS:1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, y 361.

14. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS:1 y 111, SEQ ID NOS:116 y 228, SEQ ID NOS:120 y 232, SEQ ID NOS:124 y 236, SEQ ID NOS:128 y 240, SEQ ID NOS:132 y 244, SEQ ID NOS:136 y 248, SEQ ID NOS:140 y 252, SEQ ID NOS:144 y 256, SEQ ID NOS:148 y 260, SEQ ID NOS:152 y 264, SEQ ID NOS: 156 y 268, SEQ ID NOS: 160 y 216, SEQ ID NOS: 164 y 220, SEQ ID NOS: 168 y 224, SEQ ID NOS: 172 y 272, SEQ ID NOS: 176 y 276, SEQ ID NOS: 180 y 300, SEQ ID NOS: 184 y 292, SEQ ID NOS: 188 y 280, SEQ ID NOS: 192 y 288, SEQ ID NOS: 196 y 296, SEQ ID NOS:200 y 284, SEQ ID NOS:204 y 304, SEQ ID NOS:208 y 308, SEQ ID NOS:212 y 312, SEQ ID NOS:334 y 335, SEQ ID NOS:336 y 337, SEQ ID NOS:338 y 339, SEQ ID NOS:340 y 341, SEQ ID NOS:342 y 343, SEQ ID NOS:344 y 345, SEQ ID NOS:346 y 347, SEQ ID NOS:348 y 349, SEQ ID NOS:350 y 351, SEQ ID NOS:352 y 353, SEQ ID NOS:354 y 355, SEQ ID NOS:356 y 357, SEQ ID NOS:358 y 359, SEQ ID NOS:360 y 361.

15. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOS: 1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, y 361.

16. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho dominio de unión a antígeno comprende un V_H .

17. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho V_H comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, y 360.

18. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho dominio de unión a antígeno comprende un V_L .

19. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho V_L comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, y 361.

20. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho dominio de unión a antígeno comprende un V_H y un V_L .

21. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende además un V_H en donde dicho V_H comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, y 360.

22. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho V_L comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, y 361.

23. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de: un dominio constante de IgM humana; un dominio constante de IgG1 humana; un dominio constante de IgG2 humana; un dominio constante de IgG3 humana; un dominio constante de IgG4 humana; un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana.

24. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho dominio de región constante de inmunoglobulina de cadena pesada es un dominio constante de IgG1 humana.

25. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho dominio constante de IgG1 humana comprende secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.
26. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además un dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de: un dominio constante kappa de Ig humana y un dominio constante lambda de Ig humana.
27. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 26, en donde dicho dominio de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera es un dominio constante kappa de Ig humana que comprende la secuencia de amino ácido SEQ ID NO:4.
28. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 26 en donde dicho dominio de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera es un dominio constante lambda de Ig humana que comprende la secuencia de amino ácido SEQ ID NO:5.
29. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión es seleccionada del grupo que consiste de: una molécula de inmunoglobulina, un scFv, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de dominio sencillo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv enlazada a disulfuro, un anticuerpo de domino sencillo, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, y un anticuerpo específico dual.
30. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha proteína de unión es un anticuerpo humano.

31. Una proteína de unión capaz de unirse a DLL-4 humano, dicha proteína de unión comprende: una región pesada constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; una región ligera constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5; una región pesada variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, y 360; y una región ligera variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359, y 361.

32. La proteína de unión de acuerdo con La reivindicación 31, en donde la región ligera constante de Ig es la SEQ ID NO:5.

33. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con una proteína Notch seleccionada del grupo que consiste de Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4, y combinaciones de las mismas.

34. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con Notch-1 y Notch-4.

35. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con Notch-1.
36. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con Notch-4.
37. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de DLL4.
38. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde dicha proteína de unión es capaz de neutralizar un DLL4.
39. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 38 en donde dicho DLL4 es seleccionado del grupo que consiste de: DLL4 humano, DLL4 de ratón, DLL4 cynomolgus, y DLL4 de rata.
40. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicha proteína de unión neutralizante disminuye la habilidad de DLL4 de unirse a su receptor.
41. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 38 en donde dicha proteína de unión neutralizante es capaz de reducir la angiogénesis normal.
42. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicha proteína de unión neutralizante tiene una constante de disociación (K_D) seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo

aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; y máximo 10^{-13} M.

43. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicha proteína de unión neutralizante tiene una velocidad de asociación seleccionada del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

44. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicha proteína de unión neutralizante tiene una velocidad de disociación seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-3} s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-4} s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-5} s^{-1} ; y máximo aproximadamente 10^{-6} s^{-1} .

45. Una proteína de unión marcada que comprende una proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde dicha proteína de unión está conjugada a un marcador detectable.

46. La proteína de unión marcada de la reivindicación 45, en donde el marcador detectable es seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminescente, una etiqueta bioluminescente, un marcador magnético, y biotina.

47. La proteína de unión marcada de la reivindicación 46, en donde dicho marcador es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste de: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm .

48. Un constructo de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1-32 y que comprende además un polipéptido enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina.

49. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 48, seleccionado del grupo que consiste de:

- una molécula de inmunoglobulina,
- un anticuerpo monoclonal,
- un anticuerpo quimérico,
- un anticuerpo de CDR injertada,
- un anticuerpo humanizado,
- un Fab,
- un Fab',
- un F(ab')₂,
- un Fv,
- un Fv enlazado a disulfuro,
- un scFv,
- un anticuerpo de dominio sencillo,
- un diacuerpo,
- un anticuerpo multiespecífico,
- un anticuerpo específico dual, y
- un anticuerpo biespecífico

50. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 48, en donde dicho constructo de anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de:

- un dominio constante de IgM humana,
- un dominio constante de IgG1 humana,

un dominio constante de IgG2 humana,
un dominio constante de IgG3 humana,
un dominio constante de IgG4 humana,
un dominio constante de IgE humana,
un dominio constante de IgA humana,
y un variante de dominio constante de IgG con una o más mutaciones
que alteran la resistencia a la unión al receptor neonatal Fc, receptores
Fc gamma, o C1q.

51. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 48, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del que consiste de: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y combinaciones de las mismas.

52. Un conjugado de anticuerpo que comprende un constructo de anticuerpo descrito en la reivindicación 48, en donde dicho constructo de anticuerpo está conjugado a un agente terapéutico o citotóxico.

53. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 52, en donde dicho agente terapéutico o citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de: un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

54. Un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de: un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una o más de CDR-H1, una CDR-H2, o una CDR-H3 descritas en la reivindicación 1; un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende una o más de

CDR-L1, una CDR-L2, o una CDR-L3 descritas en la reivindicación 1; o una combinación de ambos polipéptidos.

55. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 54.

56. El vector de La reivindicación 55 en donde dicho vector es seleccionado del grupo que consiste de: pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE y pBJ.

57. Una célula hospedera que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 55 y 56.

58. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dicha célula hospedera es una célula procariótica.

59. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 58, en donde dicha célula hospedera es *Escherichia coli*.

60. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 59, en donde dicha célula hospedera es una célula eucariótica.

61. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 60, en donde dicha célula eucariótica es seleccionada del grupo que consiste de: una célula de protisto, una célula animal, una célula de planta, y una célula fúngica.

62. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 61, en donde dicha célula eucariótica es una célula animal seleccionada del grupo que consiste de: una célula mamífera, una celular aviar y una célula de insecto.

63. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 62, en donde dicha célula mamífera es una célula CHO.

64. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 62, en donde dicha célula mamífera es una célula COS.

65. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 61, en donde dicha célula fúngica es *Saccharomyces cerevisiae*.

66. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 62, en donde dicha célula de insecto es una célula Sf9.

67. Un método para producir una proteína de unión que se une a DLL4 humano, que comprende cultivar la célula hospedera de una cualquiera de las reivindicaciones 57-66 en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a DLL4 humano.

68. Una proteína de unión producida de acuerdo con el método de la reivindicación 67.

69. Una proteína de unión cristalizada que comprende una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde dicha proteína de unión existe como un cristal.

70. La proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 69, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo.

71. La proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 69, en donde dicha proteína de unión tiene una vida media mayor *in vivo* que la contraparte soluble de dicha proteína de unión.

72. La proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 69, en donde dicha proteína de unión retiene la actividad biológica.

73. Una composición para la liberación de una proteína de unión, dicha composición comprende:

(a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión cristalizada, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 69-72, y un ingrediente; y

(b) al menos un vehículo polimérico.

74. La composición de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (amino ácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilen glicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maléico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

75. La composición de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicho ingrediente es seleccionado del grupo que consiste de albúmina, sacarosa,

trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilen glicol y polietilen glicol.

76. Un método para el tratamiento de un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición de acuerdo con la reivindicación 73.

77. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

78. La composición farmacéutica de la reivindicación 77 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el cual la actividad de DLL4 es perjudicial.

79. La composición farmacéutica de la reivindicación 78, en donde dicho agente adicional es seleccionado del grupo que consiste de: inhibidores de angiogénesis; inhibidores de quinasa; bloqueadores de molécula de co-estimulación; bloqueadores de molécula de adhesión; anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo; metotrexato; corticosteroides; ciclosporina; rapamicina; FK506; y agentes anti-inflamatorios no esteroidales.

80. Un método para reducir la actividad de DLL4 humano, que comprende contactar DLL4 humano con la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32 de forma que se reduce la actividad de DLL4 humano.

81. Un método para reducir la actividad de DLL4 humano en un humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de DLL4 es perjudicial, que comprende administrar al sujeto humano la proteína de unión de una

cualquiera de las reivindicaciones 1-32 de forma que se reduce la actividad de IL- 17 humana en el sujeto humano.

82. Un método para el tratamiento de un sujeto para una enfermedad o un trastorno en el cual la actividad de DLL4 es perjudicial, mediante la administración al sujeto de la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32 de forma que se logra tratamiento.

83. El método de la reivindicación 82, en donde dicho trastorno es seleccionado del grupo que consiste de: cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer pulmonar, cáncer orofaríngeo, cáncer hipofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula, cáncer de ducto biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer del tracto urinario, cáncer de tracto genital femenino, cáncer del tracto genital masculino, cáncer de glándula endocrina, cáncer de piel, hemangiomas, melanomas, sarcomas, tumor cerebral, cáncer de nervio, tumores oculares, cáncer de meninges, tumores sólidos de malignancias hematopoyéticas, metástasis de tumor, neovascularización ocular, edema, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, placas ateroscleróticas, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, ascitis refractaria, soriasis, sarcoidosis, arteriosclerosis arterial, sepsis, úlceras pépticas, quemaduras, y pancreatitis, enfermedad de ovario poliquístico (POD), endometriosis, fibroides uterinos, hipertrofia prostática benigna, y otras enfermedades independientes y dependientes de angiogénesis caracterizadas por actividad aberrante de DLL4.

84. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el trastorno es un cáncer primario y metastásico.

85. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el cáncer de tracto urinario es seleccionado del grupo que consiste de cáncer renal, cáncer de vejiga, y cáncer de urotelio.
86. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el cáncer de tracto genital femenino es seleccionado del grupo que consiste de cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer de ovario, coriocarcinoma, y enfermedad trofoblástica gestacional.
87. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el cáncer del tracto genital masculino es seleccionado del grupo que consiste de cáncer de próstata, cáncer de vesícula seminal, cáncer testicular, y tumor de célula germinal.
88. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el cáncer de glándula endocrina es seleccionado del grupo que consiste de cáncer de tiroides, cáncer adrenal, y cáncer de glándula pituitaria.
89. El método de acuerdo con La reivindicación 83, en donde el sarcoma es seleccionado del grupo que consiste de un sarcoma óseo, un sarcoma de tejido blando, y sarcoma de Kaposi.
90. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el cáncer de meninges es seleccionado del grupo que consiste de un astrocitoma, un glioma, un glioblastoma, un retinoblastoma, un neuroma, un neuroblastoma, un Schwannoma, y meningiomas.
91. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde el tumor sólido de una malignancia hematopoyética es una leucemia, una leucemia de

Hodgkin, una leucemia diferente de Hodgkin, un linfoma, un linfoma de Hodgkin, y linfomas diferentes de Hodgkin.

92. El método de acuerdo con La reivindicación 83, en donde la neovascularización ocular es seleccionada del grupo que consiste de ceguera diabética, una retinopatía, una degeneración macular inducida por la edad, y una rubeosis.

93. Un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno en el cual DLL4 es perjudicial, que comprende el paso de administrar la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32 antes, concurrente con, o después de la administración de un segundo agente, en donde el segundo agente es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unirse a VEGFR2 humano; metotrexato; un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de unirse a TNF humano; corticosteroides, ciclosporina, rapamicina, FK506, y agentes antiinflamatorios no esteroideos.

94. Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a DLL4 humano, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una o más CDRs seleccionadas del grupo que consiste de:

CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO: 105), en donde;

X₁ es S, N, o D;

X₂ es H o Y;

X₃ es W;

X₄ es M;

X₅ es S o H;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇
(SEQ ID NO: 106), en donde;

X_1 es I, D, M, o T;
 X_2 es I;
 X_3 es S;
 X_4 es Y, N, S, Q, V, T, H, o D;
 X_5 es D;
 X_6 es G;
 X_7 es S, R, I, T, G, K, H, o N;
 X_8 es N, Y, S, I, o T;
 X_9 es K, M, N, Q, E, T, R, S, A, o L;
 X_{10} es Y, D, o E;
 X_{11} es S o Y;
 X_{12} es A;
 X_{13} es D;
 X_{14} es S;
 X_{15} es V;
 X_{16} es K; y
 X_{17} es G;

CDR-H3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} (SEQ ID NO: 107), en donde;

X_1 es A;
 X_2 es G, A, o R;
 X_3 es G;
 X_4 es G, S, o A;
 X_5 es N;
 X_6 es V o M;
 X_7 es G;
 X_8 es F, L, Y, o M;
 X_9 es D; y
 X_{10} es I, S, o L;

CDR-L1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO: 108), en donde;

X₁ es S;
X₂ es A o G;
X₃ es D;
X₄ es K, N, L, Q, M, E, S, T, G, o D;
X₅ es L;
X₆ es G;
X₇ es T, S, N, A, G, o E;
X₈ es K, Q, N, o R;
X₉ es Y;
X₁₀ es V o I; y
X₁₁ es S;

CDR-L2 X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 109), en donde;

X₁ es Q;
X₂ es D;
X₃ es A, G, W, S, o D;
X₄ es K, M, Q, N, L, T, I, o E;
X₅ es R;
X₆ es P; y
X₇ es S;

y

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 110), en donde;

X₁ es Q;
X₂ es S o A;
X₃ es W;
X₄ es D;
X₅ es R, S, Q, P, A, V, W, o M;
X₆ es S, G, I, N, R, o T;
X₇ es D o G;

X_8 es V, A, P, o E; y

X_9 es V.

95. La proteína de unión de acuerdo con La reivindicación 94, en donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

residuos 31-35 de SEQ ID NO:112 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:112 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:112 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:113 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:113 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:113 (CDR-L3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:316 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:316 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:316 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:317 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:317 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:317 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:318 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:318 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:318 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:319 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:319 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:319 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:320 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:320 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:320 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:321 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:321 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:321 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:322 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:322 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:322 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:323 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:323 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:323 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:324 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:324 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:324 (CDR-H3);

residuos 31-35 de SEQ ID NO:325 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:325 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:325 (CDR-H3);
 residuos 31-35 de SEQ ID NO:326 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:326 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:326 (CDR-H3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:327 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:327 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:327 (CDR-L3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:328 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:328 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:328 (CDR-L3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:329 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:329 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:329 (CDR-L3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:330 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:330 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:330 (CDR-L3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:331 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:331 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:331 (CDR-L3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:332 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:332 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:332 (CDR-L3);
 residuos 23-33 de SEQ ID NO:333 (CDR-L1); residuos 49-55 de SEQ ID NO:333 (CDR-L2); residuos 88-96 de SEQ ID NO:333 (CDR-L3).

96. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 95, en donde dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDRs.

97. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 96, en donde dichas al menos 3 CDRs comprenden un conjunto de CDR de dominio variable seleccionado del grupo que consiste de:

Conjunto de CDR VH A10

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:112

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:112

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:112

Conjunto de CDR VL A10

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:113

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:113

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO: 113

Conjunto de CDR VH A10.3

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:316

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:316

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:316

Conjunto de CDR VL A10.3

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:327

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:327

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:327

Conjunto de CDR VH A10.K30

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:317

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:317

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:317

Conjunto de CDR VH A10.K42

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:318

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:318

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:318

Conjunto de CDR VH A10.9A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:319

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:319

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:319

Conjunto de CDR VH A10.8A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:320

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:320

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:320

Conjunto de CDR VH A10.1A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:321

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:321

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:321

Conjunto de CDR VH A10.5D

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:322

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:322

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:322

Conjunto de CDR VH A10.3A

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:323

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:323

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:323

Conjunto de CDR VL A10.3A

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:330

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:330

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:330

Conjunto de CDR VH A10.6B

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:324

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:324

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:324

Conjunto de CDR VL A10.6B

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:331

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:331

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:331

Conjunto de CDR VH A10.3D

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:325

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:325

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:325

Conjunto de CDR VL A10.3D

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:332

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:332

CDR-L3 : residuos 88-96 de SEQ ID NO:332

Conjunto de CDR VH A10.4C

CDR-H1: residuos 31-35 de SEQ ID NO:326

CDR-H2: residuos 50-66 de SEQ ID NO:326

CDR-H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO:326

Conjunto de CDR VL A10.4C

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:333

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:333

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:333

Conjunto de CDR VL A10.L45

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:328

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:328

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:328

Conjunto de CDR VL A10.L73

CDR-L1: residuos 23-33 de SEQ ID NO:329

CDR-L2: residuos 49-55 de SEQ ID NO:329

CDR-L3: residuos 88-96 de SEQ ID NO:329

98. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 97, que comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.

99. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 98, en donde dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan de un grupo que consiste de:

Conjunto de CDR VH A10 y Conjunto de CDR VL A10;
 Conjunto de CDR VH A10.3 y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.3A y Conjunto de CDR VL A10.3A;
 Conjunto de CDR VH A10.6B y Conjunto de CDR VL A10.6B;
 Conjunto de CDR VH A10.3D y Conjunto de CDR VL A10.3D;
 Conjunto de CDR VH A10.4C y Conjunto de CDR VL A10.4C;
 Conjunto de CDR VH A10.K30 y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.K42 y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.3 y Conjunto de CDR VL A10.L45;
 Conjunto de CDR VH A10.3 y Conjunto de CDR VL A10.L73;
 Conjunto de CDR VH A10.9A y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.8A y Conjunto de CDR VL A10.3;
 Conjunto de CDR VH A10.1A y Conjunto de CDR VL A10.3; y
 Conjunto de CDR VH A10.5D y Conjunto de CDR VL A10.3.

100. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 94-99, que comprende además un marco aceptor humano.

101. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 100, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

secuencias de marco aceptor de cadena pesada SEQ ID NOS:6-22,
secuencias aceptoras de cadena pesada SEQ ID NOS:35-62,
secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:23-34, y
secuencias aceptoras de cadena ligera SEQ ID NOS:63-98.

102. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 100 o la reivindicación 101, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

103. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 101, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de región de marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

un residuo adyacente a una CDR;
un residuo de sitio de glicosilación;
un residuo raro;
un residuo capaz de interactuar con DLL4 humano
un residuo canónico;
un residuo de contacto entre una región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera;
un residuo dentro de una zona Vernier; y

un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada primero definido por Kabat.

104. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 103, en donde el residuo clave seleccionado del grupo que consiste de: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L, 95L.

105. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 104, en donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

106. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 94, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328, y 329.

107. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 106, en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS:112 y 113, SEQ ID NOS:316 y 327, SEQ ID NOS:323 y 330, SEQ ID NOS:324 y 331, SEQ ID NOS:325 y 332, y SEQ ID NOS:326 y 333.

108. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 104, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328, y 329.

109. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 95 en donde dicho dominio de unión a antígeno comprende un V_H .

110. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 109 en donde dicho V_H comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, y 326.

111. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 95, en donde dicho dominio de unión a antígeno comprende un V_L .

112. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 111 en donde dicho V_L comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332, y 333.

113. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 95, en donde dicho dominio de unión a antígeno comprende un V_H y un V_L .

114. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 112, que comprende además un V_H en donde dicho V_H comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: SEQ ID NOS: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, y 326.

115. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho V_L comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332, y 333.

116. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 95, que comprende además un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana.

117. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 117, en donde dicho dominio de región constante de inmunoglobulina de cadena pesada es un dominio constante de IgG1 humana.

118. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 117, en donde dicho dominio constante de IgG1 humana comprende secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.

119. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 95, que comprende además un dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de: un dominio constante kappa de lh humana y un dominio constante lambda de Ig humana.

120. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 119, en donde dicho dominio de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera es un dominio constante kappa de Ig humana que comprende la secuencia de amino ácido SEQ ID NO: 4.

121. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 119, en donde dicho dominio de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera es un dominio constante lambda de Ig humana que comprende la secuencia de amino ácido SEQ ID NO:5.

122. La proteína de unión de acuerdo con La reivindicación 94 en donde dicha proteína de unión es seleccionada del grupo que consiste de: una molécula de inmunoglobulina, un scFv, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de dominio sencillo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv enlazada a disulfuro, un anticuerpo de domino sencillo, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, y un anticuerpo específico dual.

123. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 122, en donde dicha proteína de unión es un anticuerpo humano.

124. Una proteína de unión capaz de unirse a DLL-4 humano, dicha proteína de unión comprende: una región pesada constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3;

una región ligera constante de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5;

una región pesada variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: SEQ ID NOS: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, y 326; y

una región ligera variable de Ig que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NOS: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332, y 333.

125. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 124, en donde la región ligera constante de Ig es la SEQ ID NO:5.

126. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 94-125, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con una proteína Notch seleccionada del grupo que consiste de Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4, y combinaciones de las mismas.

127. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 126, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con Notch-1 y Notch-4.

128. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 126, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con Notch-1.

129. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 126, en donde la proteína de unión es capaz de bloquear la interacción de DLL4 con Notch-4.

130. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 94-125, en donde la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de DLL4.

131. La proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 94-125, en donde dicha proteína de unión es capaz de neutralizar un DLL4.

132. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 131, en donde dicho DLL4 es seleccionado del grupo que consiste de: DLL4 humano, DLL4 de ratón, DLL4 cynomolgus, y DLL4 de rata.

133. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con La reivindicación 131, en donde dicha proteína de unión neutralizante disminuye la habilidad de DLL4 de unirse a su receptor.

134. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 131, en donde dicha proteína de unión neutralizante es capaz de reducir la angiogénesis normal.

135. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 131, en donde dicha proteína de unión neutralizante tiene una constante de disociación (K_D) seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; y máximo 10^{-13} M.

136. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 131, en donde dicha proteína de unión neutralizante tiene una velocidad de asociación seleccionada del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

137. La proteína de unión neutralizante de acuerdo con la reivindicación 131, en donde dicha proteína de unión neutralizante tiene una velocidad de disociación seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente

10^{-3}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; y máximo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} .

138. Una proteína de unión marcada que comprende una proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 94-137, en donde dicha proteína de unión está conjugada a un marcador detectable.

139. La proteína de unión marcada de la reivindicación 138, en donde el marcador detectable es seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminescente, una etiqueta bioluminescente, un marcador magnético, y biotina.

140. La proteína de unión marcada de la reivindicación 139, dicho marcador es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste de: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm .

141. Un constructo de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita en cualquiera de las reivindicaciones 94- 137 y que comprende además un polipéptido enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina.

142. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 141, seleccionado del grupo que consiste de:

- una molécula de inmunoglobulina,
- un anticuerpo monoclonal,
- un anticuerpo quimérico,
- un anticuerpo de CDR injertada,
- un anticuerpo humanizado,
- un Fab,
- un Fab',

un F(ab')₂,
 un Fv,
 un Fv enlazado a disulfuro,
 un scFv,
 un anticuerpo de dominio sencillo,
 un diacuerpo,
 un anticuerpo multiespecífico,
 un anticuerpo específico dual, y
 un anticuerpo biespecífico

143. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 141, en donde dicho constructo de anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de:

un dominio constante de IgM humana,
 un dominio constante de IgG1 humana,
 un dominio constante de IgG2 humana,
 un dominio constante de IgG3 humana,
 un dominio constante de IgG4 humana,
 un dominio constante de IgE humana,
 un dominio constante de IgA humana,
 y un variante de dominio constante de IgG con una o más mutaciones que alteran la resistencia a la unión al receptor neonatal Fc, receptores Fc gamma, o C1q.

144. El constructo de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 141, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del que consiste de: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y combinaciones de las mismas.

145. Un conjugado de anticuerpo que comprende un constructo de anticuerpo descrito en la reivindicación 141, en donde dicho constructo de anticuerpo está conjugado a un agente terapéutico o citotóxico.

146. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 145, en donde dicho agente terapéutico o citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de: un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

147. Un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de: un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una o más de CDR-H1, una CDR-H2, o una CDR-H3 descritas en la reivindicación 94; un polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende una o más de CDR-L1, una CDR-L2, o una CDR-L3 descritas en la reivindicación 94; o una combinación de ambos polipéptidos.

148. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 147.

149. El vector de la reivindicación 148 en donde vector es seleccionado del grupo que consiste de: pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE y pBJ.

150. Una célula hospedera que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 148 y 149.

151. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 150, en donde célula hospedera es una célula procariótica.

152. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 151, en donde dicha célula hospedera es *Escherichia coli*.

153. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 152, en donde dicha célula hospedera es una célula eucariótica.

154. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 153, en donde dicha célula eucariótica es seleccionada del grupo que consiste de: una célula de protisto, una célula animal, una célula de planta, y una célula fúngica.

155. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 154, en donde dicha célula eucariótica es una célula animal seleccionada del grupo que consiste de: una célula mamífera, una celular aviar y una célula de insecto.

156. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 155, en donde dicha célula mamífera es una célula CHO.

157. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 155, en donde dicha célula mamífera es una célula COS.

158. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 154, en donde dicha célula fúngica es *Saccharomyces cerevisiae*.

159. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 155, en donde dicha célula de insecto es una célula Sf9.

160. Un método para producir una proteína de unión que se une a DLL4 humano, que comprende cultivar la célula hospedera de una cualquiera de las

reivindicaciones 150-159 en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a DLL4 humano.

161. Una proteína de unión producida de acuerdo con el método de la reivindicación 160.

162. Una proteína de unión cristalizada que comprende una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 94-137, en donde dicha proteína de unión existe como un cristal.

163. La proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 162, en donde dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo.

164. La proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 162, en donde dicha proteína de unión tiene una vida media mayor *in vivo* que la contraparte soluble de dicha proteína de unión.

165. La proteína de unión cristalizada de acuerdo con la reivindicación 162, en donde dicha proteína de unión retiene la actividad biológica.

166. Una composición para la liberación de una proteína de unión, dicha composición comprende:

- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión cristalizada, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 162-165, y un ingrediente; y
- (b) al menos un vehículo polimérico.

167. La composición de acuerdo con la reivindicación 166, en donde dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (amino ácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutriato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilen glicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maléico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

168. La composición de acuerdo con la reivindicación 166, en donde dicho ingrediente es seleccionado del grupo que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilen glicol y polietilen glicol.

169. Un método para el tratamiento de un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición de acuerdo con la reivindicación 166.

170. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 94-137, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

172. La composición farmacéutica de la reivindicación 170 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el cual la actividad de DLL4 es perjudicial.

173. La composición farmacéutica de la reivindicación 172, en donde dicho agente adicional es seleccionado del grupo que consiste de: inhibidores de angiogénesis; inhibidores de quinasa; bloqueadores de molécula de co-estimulación; bloqueadores de molécula de adhesión; anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo; metotrexato; corticosteroides; ciclosporina; rapamicina; FK506; y agentes anti-inflamatorios no esteroideos.

174. Un método para reducir la actividad de DLL4 humano, que comprende contactar DLL4 humano con la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 94-137 de forma que se reduce la actividad de DLL4 humano.

175. Un método para reducir la actividad de DLL4 humano en un humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de DLL4 es perjudicial, que comprende administrar al sujeto humano la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 94-137 de forma que se reduce la actividad de IL- 17 humana en el sujeto humano.

176. Un método para el tratamiento de un sujeto para una enfermedad o un trastorno en el cual la actividad de DLL4 es perjudicial, mediante la administración al sujeto de la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 94-137 de forma que se logra tratamiento.

177. El método de la reivindicación 176, en donde dicho trastorno es seleccionado del grupo que consiste de: cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer pulmonar, cáncer orofaríngeo, cáncer hipofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula, cáncer de ducto biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer del tracto urinario, cáncer de tracto genital femenino, cáncer del tracto genital masculino, cáncer de glándula endocrina, cáncer de piel, hemangiomas, melanomas, sarcomas, tumor cerebral, cáncer de nervio, tumores oculares,

cáncer de meninges, tumores sólidos de malignancias hematopoyéticas, metástasis de tumor, neovascularización ocular, edema, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, placas ateroscleróticas, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, ascitis refractaria, soriasis, sarcoidosis, arteriosclerosis arterial, sepsis, úlceras pépticas, quemaduras, y pancreatitis, enfermedad de ovario poliquístico (POD), endometriosis, fibroides uterinos, hipertrofia prostática benigna, y otras enfermedades independientes y dependientes de angiogénesis caracterizadas por actividad aberrante de DLL4.

178. El método de acuerdo con la reivindicación 177, en donde el trastorno es un cáncer primario y metastásico.

179. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el cáncer de tracto urinario es seleccionado del grupo que consiste de cáncer renal, cáncer de vejiga, y cáncer de urotelio.

180. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el cáncer de tracto genital femenino es seleccionado del grupo que consiste de cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer de ovario, coriocarcinoma, y enfermedad trofoblástica gestacional.

181. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el cáncer del tracto genital masculino es seleccionado del grupo que consiste de cáncer de próstata, cáncer de vesícula seminal, cáncer testicular, y tumor de célula germinal.

182. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el cáncer de glándula endocrina es seleccionado del grupo que consiste de cáncer de tiroides, cáncer adrenal, y cáncer de glándula pituitaria.

183. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el sarcoma es seleccionado del grupo que consiste de un sarcoma óseo, un sarcoma de tejido blando, y sarcoma de Kaposi.

184. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el cáncer de meninges es seleccionado del grupo que consiste de un astrocitoma, un glioma, un glioblastoma, un retinoblastoma, un neuroma, un neuroblastoma, un Schwannoma, y meningiomas.

185. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde el tumor sólido de una malignancia hematopoyética es una leucemia, una leucemia de Hodgkin, una leucemia diferente de Hodgkin, un linfoma, un linfoma de Hodgkin, y linfomas diferentes de Hodgkin.

186. El método de acuerdo con La reivindicación 177, en donde la neovascularización ocular es seleccionada del grupo que consiste de ceguera diabética, una retinopatía, una degeneración macular inducida por la edad, y una rubeosis.

187. Un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno en el cual DLL4 es perjudicial, que comprende el paso de administrar la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 94-137 antes, concurrente con, o después de la administración de un segundo agente, en donde el segundo agente es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unirse a VEGFR2 humano; metotrexato; un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de unirse a TNF humano; corticosteroides, ciclosporina, rapamicina, FK506, y agentes antiinflamatorios no esteroideos.

338393.TXT
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories, Inc.
Morgan-Lappe, Susan E

<120> PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DE UNIÓN A DLL4

<130> 10289.WO.01

<150> US 61/238,152

<151> 2009-08-29

<150> US 61/261,728

<151> 2009-11-16

<160> 377

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 Página 2

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutante de la región constante IgG1

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

338393.TXT

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

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

338393.TXT

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6
<211> 30

338393.TXT

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH2-70/JH6 FR1

<400> 6

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH2-70/JH6 FR2

<400> 7

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH2-70/JH6 FR3

<400> 8

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH2-70/JH6 FR4

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10

338393.TXT

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

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH2-26/JH6 FR1
<400> 10

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH2-26/JH6 FR3
<400> 11

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 12
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH3-72/JH6 FR1
<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH3-72/JH6 FR2
<400> 13

338393.TXT
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH3-72/JH6 FR3
<400> 14

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH3-21/JH6 FR1
<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH3-21/JH6 FR2
<400> 16

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

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH3-21/JH6 FR3
<400> 17

338393.TXT

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 18
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH1-69/JH6 FR1

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH1-69/JH6 FR2

<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 20
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH1-69/JH6 FR3

<400> 20

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH1-18/JH6 FR1

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada VH1-18/JH6 FR3

<400> 22

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena ligera B3/JK4 FR1

<400> 23

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena ligera B3/JK4 FR2

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

338393.TXT

<210> 25
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera B3/JK4 FR3

<400> 25

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera B3/JK4 FR4

<400> 26

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera L2/JK4 FR1

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera L2/JK4 FR2

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

338393.TXT

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera L2/JK4 FR3

<400> 29

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera L15/JK4 FR1

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera L15/JK4 FR2

<400> 31

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera L15/JK4 FR3

<400> 32

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Página 12

338393.TXT

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 33
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera L5/JK4 FR1

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera L5/JK4 FR2

<400> 34

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59 FR1

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

338393.TXT

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59 FR2

<400> 36

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59 FR3

<400> 37

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59/JH FR4

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-66 FW1

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-66 FW2

<400> 40

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-66 FW3

<400> 41

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-66/JH FW4

<400> 42

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59 FR1

<400> 43

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59 FR2

<400> 44

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59 FR3

<400> 45

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV4-59/JH FR4

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV5-51 FR1

<400> 47

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 48
<211> 14
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV5-51 FR2

<400> 48

Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV5-51 FR3

<400> 49

Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe Phe Leu Gln
1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV5-51/JH FR4

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV2-70 FR1

<400> 51

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 52

<211> 14

338393.TXT

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV2-70 FR2
<400> 52

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV2-70 FR3
<400> 53

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV2-70/JH FR4
<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-15 FR1
<400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg
20 25 30

<210> 56

338393.TXT

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

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-15 FR2
<400> 56

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-15 FR3
<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-15/JH FR4
<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-43 FR1
<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly
20 25 30

338393.TXT

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-43 FR2
<400> 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-43 FR3
<400> 61

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena pesada IGHV3-43/JH FR4
<400> 62

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 63
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR1
<400> 63

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

338393.TXT

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR2

<400> 64

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 65
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR3

<400> 65

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1/JL FR4

<400> 66

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 67
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR1

<400> 67

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR2

<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR3

<400> 69

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1/JL FR4

<400> 70

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR1

<400> 71

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

Ala Ser Ile Thr Cys

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR2

<400> 72

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR3

<400> 73

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1/JL FR4

<400> 74

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 1 5 10

<210> 75
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR1

<400> 75

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR2
<400> 76

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 77
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR3
<400> 77

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1/JL FR4
<400> 78

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 79
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV6D-21 FR1
<400> 79

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV6D-21 FR2
<400> 80

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 81
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV6D-21 FR3
<400> 81

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV6D-21/JK FR4
<400> 82

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 83
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV3D-15 FR1
<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV3D-15 FR2
<400> 84

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 85
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV3D-15 FR3
<400> 85

Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV3D-15/JK FR4
<400> 86

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 87
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV4-1 FR1
<400> 87

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
Página 26

1 5 338393.TXT 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV4-1 FR2
<400> 88

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 89
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV4-1 FR3
<400> 89

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGKV4-1/JK FR4
<400> 90

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 91
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR1
<400> 91

338393.TXT
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 92
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR2
<400> 92

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 93
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR3
<400> 93

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1/JL FR4
<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

<210> 95
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR1
<400> 95

338393.TXT

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR2
<400> 96

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 97
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1 FR3
<400> 97

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia del aceptor de cadena ligera IGLV3-1/JL FR4
<400> 98

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-H1 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X es S o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X es S, G o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X es S, N, T, G o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X es Y o H

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Gly
1 5

<210> 100
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-H2 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X es Y, N o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X es T, N, A, I, S o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X es S, N, T o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X es S, N, D o G

<400> 100

Asp Ile Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Xaa
1 5 10 15

<210> 101
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-H3 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X es E, Y, F, Q, W, L o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X es D, A, S, G, V, E o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X es V, M, L, P o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M, o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X es L, Y, F o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X es R, G, S, Q o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X es G, A o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X es S, A, L, V, R o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X es Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q o K

<400> 101

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa
1 5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>
<223> secuencia consenso CDR-L1 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X es Q, E o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es R, S, G, M, K, L o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X es D o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X es A o V

<400> 102

Ser Gly Xaa Xaa Leu Gly Xaa Lys Tyr Xaa Ser
1 5 10

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-L2 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X es E o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X es S, L, T, A, E o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es K, T, E, N, Q, S, o M

<400> 103

Xaa Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia consenso CDR-L3 de anticuerpo DLL4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X es R, S, M, E, N, G o K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X es D o E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X es T, V, A, S o M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X es G, A o C

<400> 104

Gln Ala Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val
1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia consenso CDR-H1 de anticuerpo DLL4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X es S, N o D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X es H o Y

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X es S o H

<400> 105

Xaa Xaa Trp Met Xaa
1 5

<210> 106

<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-H2 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X es I, D, M o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es Y, N, S, Q, V, T, H o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X es S, R, I, T, G, K, H o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X es N, Y, S, I o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X es K, M, N, Q, E, T, R, S, A o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X es Y, D o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X es S o Y

<400> 106
Xaa Ile Ser Xaa Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-H3 de anticuerpo DLL4

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X es G, A o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es G, S o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X es V o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X es F, L, Y o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X es I, S o L

<400> 107

Ala Xaa Gly Xaa Asn Xaa Gly Xaa Asp Xaa
1 5 10

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia consenso CDR-L1 de anticuerpo DLL4

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X es A o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X es K, N, L, Q, M, E, S, T, G o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X es T, S, N, A, G o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X es K, Q, N o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X es V o I

<400> 108

Ser Xaa Asp Xaa Leu Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Ser
1 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia consenso CDR-L2 de anticuerpo DLL4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X es A, G, W, S o D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X es K, M, Q, N, L, T, I o E

<400> 109

Gln Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia consenso CDR-L3 de anticuerpo DLL4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X es S o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X es R, S, Q, P, A, V, W o M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X es S, G, I, N, R o T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X es D o G

<220>

<221> MISC_FEATURE

338393.TXT

<222> (8)..(8)

<223> X es V, A, P o E

<400> 110

Gln Ser Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val
1 5

<210> 111

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
100 105

<210> 112

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

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

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

338393.TXT

Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 113
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val
20 25 30

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

Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 114
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutaciones de la secuencia VH de anticuerpo E9

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> X es S, N, G o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> X es S o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> X es S, G o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> X es S, N, T, G o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42)..(42)
<223> X es P, S o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54)
<223> X es Y o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> X es T, N, A, I, S o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> X es S, N, T o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> X es S, N, D o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(90)
<223> X es A o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(100)
<223> X es E, Y, F, Q, W, L o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es D, A, S, G, V, E o N

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> X es V, M, L o P

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (103)..(103)

<223> X es I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M o E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (104)..(104)

<223> X es L, Y, F o M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> X es R, G, S, Q o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> X es G, S o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (108)..(108)

<223> X es S, A, L, V o R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (110)..(110)

<223> X es Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I o M

<400> 114

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Xaa Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 338393.TXT
115 120

<210> 115
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutaciones de la secuencia VL de anticuerpo E9

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es Q, E o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> X es R, S, G, M, K, L o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> X es D o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> X es A o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(49)
<223> X es E o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> X es S, L, T, A, E o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> X es K, T, E, N, Q, S o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> X es P o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (92)..(92)
<223> X es R, S, M, E, N o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> X es D o E

338393.TXT

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 <223> X es T, V, A, S o M

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> X es G, A o C

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X es Y o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (102)..(102)
 <223> X es R o K

<400> 115

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Xaa Xaa Leu Gly Xaa Lys Tyr Xaa
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Xaa Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val
 85 90 95

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 116
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VH del anticuerpo DLL4 E9.4 madurado por afinidad

<400> 116

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

338393.TXT

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Tyr Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Ser Asp His Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.4
<400> 117

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.4

<400> 118

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.4

<400> 119

Tyr Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Ser Asp His
 1 5 10

<210> 120

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH del anticuerpo DLL4 E9.11

<400> 120

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Pro Leu Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.11

<400> 121

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 122
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.11

<400> 122

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.11

<400> 123

Glu Ala Val Pro Leu Gly Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 124
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.14

<400> 124

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser
20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.14

<400> 125

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly
1 5

<210> 126
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.14

<400> 126

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 127
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.14

<400> 127

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 128
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.17

<400> 128

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

338393.TXT

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Glu Ala Ile Leu Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.17

<400> 129

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 130
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.17

<400> 130

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.17

<400> 131

Glu Glu Ala Ile Leu Gly Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 132

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 132

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 133

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 134

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 135

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 136
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.19

<400> 136

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Gly Ser Asp Thr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.19
<400> 137

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 138
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.19
<400> 138

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.19
<400> 139

Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Gly Ser Asp Thr
1 5 10

<210> 140
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.22
<400> 140

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 50

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser
20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.22
<400> 141

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly
1 5

<210> 142
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.22
<400> 142

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
1 5 10 15

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.22

<400> 143

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 144

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.48

<400> 144

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.48

<400> 145

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 146
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.48

<400> 146

Asp Ile Asn Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.48

<400> 147

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 148
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 148

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Ser
 20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 149

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly
1 5

<210> 150
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 150

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
1 5 10 15

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 151

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 152
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 152

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 54

338393.TXT

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Lys Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 153
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 153

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 154
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 154

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 155

Glu Gly Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Lys
 1 5 10

<210> 156

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.71

<400> 156

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.71

<400> 157

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 158
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.71

<400> 158

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 159
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.71

<400> 159

Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys
1 5 10

<210> 160
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 160

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 161
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 161

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 162
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 162

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 163

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 164
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 164

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 58

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 165

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 166
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 166

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 167

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 168

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 168

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 169

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 170
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 170

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 171

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 172
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.2B

<400> 172

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asp Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.2B
<400> 173

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 174
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.2B
<400> 174

Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.2B
<400> 175

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asp
1 5 10

<210> 176
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.1F
<400> 176

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 62

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 177
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.1F
 <400> 177

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 178
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.1F
 <400> 178

Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 179
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.1F

<400> 179

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Gly Ala Asp Ser
 1 5 10

<210> 180

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.10H

<400> 180

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Glu Val Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Gln Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 181

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.10H

<400> 181

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 182
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.10H

<400> 182

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.10H

<400> 183

Glu Glu Val Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Gln
 1 5 10

<210> 184
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.5E

<400> 184

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Glu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 185
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.5E
<400> 185

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 186
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.5E
<400> 186

Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 187
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.5E
<400> 187

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Glu
1 5 10

<210> 188
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.10C
<400> 188

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 66

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 189
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.10C
 <400> 189

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 190
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.10C
 <400> 190

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 191
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.10C

<400> 191

Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Asp Asn
1 5 10

<210> 192

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 192

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Met Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 193

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 193

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 194
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 194

Asp Ile Tyr Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 195
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 195

Glu Asp Met Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn
 1 5 10

<210> 196
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.12B

<400> 196

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 197
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.12B
<400> 197

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 198
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.12B
<400> 198

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 199
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.12B
<400> 199

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Gly Ala Asp Ser
1 5 10

<210> 200
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.10E
<400> 200

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 70

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
 20 25 30
 Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Gly Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 201
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.10E
 <400> 201

Ser Gly Asn Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 202
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.10E
 <400> 202

Asp Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 203
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.10E

<400> 203

Glu Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Gly Asp Ser
1 5 10

<210> 204

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.6A

<400> 204

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 205

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.6A

<400> 205

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1

5

<210> 206
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.6A
<400> 206

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 207
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.6A
<400> 207

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Ser
1 5 10

<210> 208
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.7A
<400> 208

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

338393.TXT

Cys Ala Arg Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Gly Ala Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.7A
<400> 209

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 210
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.7A
<400> 210

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 211
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.7A
<400> 211

Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Gly Ala Asp Leu
1 5 10

<210> 212
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.8H
<400> 212

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
Página 74

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> CDR-H1 de anticuerpo DLL4 E9.8H
 <400> 213

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 214
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-H2 de anticuerpo DLL4 E9.8H
 <400> 214

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 215
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-H3 de anticuerpo DLL4 E9.8H

<400> 215

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn
 1 5 10

<210> 216

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 216

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Thr Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 217

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 217

Ser Gly Asp Thr Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 218

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

<220>
 <223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 218

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 219
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.13

<400> 219

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 220
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 220

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 221
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 221

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 222

Glu Asp Phe Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.16

<400> 223

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 224
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 224

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
Página 78

35

40

45

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Val Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 225
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 225

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 226
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 226

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 227
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.38

<400> 227

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Val Gly Val
 1 5

<210> 228
 <211> 106

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.4

<400> 228

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 229
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.4

<400> 229

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 230
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.4

<400> 230

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

338393.TXT

<210> 231
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.4
 <400> 231

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 232
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.11
 <400> 232

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 233
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.11
 <400> 233

338393.TXT
Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 234
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.11

<400> 234

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 235
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.11

<400> 235

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 236
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.14

<400> 236

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
Página 82

85

338393.TXT
90

95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 237
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.14
<400> 237

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 238
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.14
<400> 238

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.14
<400> 239

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 240
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.17
<400> 240

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

338393.TXT

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 241
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.17
<400> 241

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 242
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.17
<400> 242

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 243
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.17
<400> 243

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

406

1

5

<210> 244
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 244

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 245
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 245

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 246
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 246

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 247

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.18

<400> 247

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 248

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.19

<400> 248

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 249

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.19

<400> 249

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 250

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.19

<400> 250

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 251

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.19

<400> 251

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 252

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.22

<400> 252

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

338393.TXT
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 253
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.22

<400> 253

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 254
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.22

<400> 254

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 255
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.22

<400> 255

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 256
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.48

<400> 256

338393.TXT

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 257
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.48
<400> 257

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 258
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.48
<400> 258

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 259
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

338393.TXT
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.48

<400> 259

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 260

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 260

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 261

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 261

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 262

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 262

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.65

<400> 263

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 264

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 264

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

338393.TXT

<210> 265
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 265

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 266
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 266

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 267
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.66

<400> 267

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 268
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.71

<400> 268

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

338393.TXT

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 269
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.71
<400> 269

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 270
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.71
<400> 270

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 271
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.71
<400> 271

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 272
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.2B

<400> 272

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 273

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.2B

<400> 273

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 274

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.2B

<400> 274

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser
1 5

<210> 275

338393.TXT

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.2B
<400> 275

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
1 5

<210> 276
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.1F
<400> 276

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 277
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.1F
<400> 277

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 278
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.1F
 <400> 278

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 279
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.1F
 <400> 279

Gln Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val
 1 5

<210> 280
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.10C
 <400> 280

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 281
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.10C
<400> 281

Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 282
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.10C
<400> 282

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 283
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.10C
<400> 283

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
1 5

<210> 284
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.10E
<400> 284

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 285
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.10E

<400> 285

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 286
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.10E

<400> 286

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 287
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.10E

<400> 287

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val
1 5

338393.TXT

<210> 288
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 288

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 289
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 289

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 290
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.7E

<400> 290

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 291
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.7E
<400> 291

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val
1 5

<210> 292
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.5E
<400> 292

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 293
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.5E

<400> 293

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 294

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.5E

<400> 294

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 295

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.5E

<400> 295

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 296

<211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.12B

<400> 296

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val
 20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

338393.TXT

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 297
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.12B
<400> 297

Ser Gly Asp Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 298
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.12B
<400> 298

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser
1 5

<210> 299
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.12B
<400> 299

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ser Gly Val
1 5

<210> 300
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.10H
<400> 300

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

338393.TXT

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Gly Glu Thr Gly Val
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 301
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.10H
<400> 301

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 302
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.10H
<400> 302

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 303
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.10H
<400> 303

338393.TXT

Gln Ala Trp Asp Gly Glu Thr Gly Val
1 5

<210> 304
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.6A

<400> 304

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 305
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.6A

<400> 305

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 306
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

338393.TXT
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.6A

<400> 306

Glu Asp Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 307

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.6A

<400> 307

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
1 5

<210> 308

<211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.7A

<400> 308

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 309

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.7A

<400> 309

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 310

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.7A

<400> 310

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser
1 5

<210> 311

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.7A

<400> 311

Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val
1 5

<210> 312

<211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.8H

<400> 312

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

338393.TXT

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 313
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L1 de anticuerpo DLL4 E9.8H

<400> 313

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 314
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L2 de anticuerpo DLL4 E9.8H

<400> 314

Glu Asp Ser Met Arg Pro Ser
1 5

<210> 315
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR-L3 de anticuerpo DLL4 E9.8H

<400> 315

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Val Gly Val
1 5

<210> 316
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.3

338393.TXT

<400> 316

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 317

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.K30

<400> 317

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

338393.TXT

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 318
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.K42

<400> 318

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

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

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

Ala Met Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 319
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.9A

338393.TXT

<400> 319

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 320

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.8A

<400> 320

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

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

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

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

338393.TXT

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 321
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.1A
<400> 321

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

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

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

Ala Met Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 322
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.5D
Página 111

338393.TXT

<400> 322

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

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

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

Ala Asp Ile Ser Val Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 323

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.3A

<400> 323

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

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

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

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 324
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.6B
<400> 324

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

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

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

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 325
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.3D

<400> 325

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

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

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

Ala Asp Ile Ser Gln Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 326

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 A10.4C

<400> 326

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

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

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

Ala Asp Ile Ser Asn Asp Gly Arg Tyr Ala Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 327
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.3
<400> 327

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 328
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.L45
<400> 328

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1

5

10

15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Glu Leu Gly Thr Gln Tyr Val
20 25 30

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

Gln Asp Ala Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 329

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.L73

<400> 329

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

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

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

338393.TXT

<210> 330
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.3A

<400> 330

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Glu Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Ala Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser Gly Ala Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 331
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.6B

<400> 331

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Gly Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 332
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.3D
<400> 332

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 333
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 A10.4C
<400> 333

338393.TXT

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

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

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 334
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.1
<400> 334

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
Página 119

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 335
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.1

<400> 335

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 336
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE1

<400> 336

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

338393.TXT

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 337
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE1

<400> 337

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 338

338393.TXT

<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE2
<400> 338

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 339
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE2
<400> 339

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

338393.TXT
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 340
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE3

<400> 340

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 341
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE3

<400> 341

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 342

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE4

<400> 342

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

338393.TXT
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 343
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE4
<400> 343

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 344
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE5
<400> 344

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

338393.TXT

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 345
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE5

<400> 345

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr
20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile
35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly
85 90 95

338393.TXT
Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 346
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE6

<400> 346

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 347
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE6

<400> 347

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

338393.TXT

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 348
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE7
<400> 348

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

338393.TXT

<210> 349
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE7
<400> 349

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr
20 25 30
Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile
35 40 45
Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly
85 90 95
Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 350
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-SE8
<400> 350

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

Página 129

338393.TXT

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 351
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-SE8
<400> 351

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr
20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile
35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly
85 90 95

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

<210> 352
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-FR1

<400> 352

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe
65 70 75 80

Phe Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 353

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-FR1

<400> 353

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr
20 25 30

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

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

338393.TXT

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly
85 90 95

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

<210> 354
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9-FR2
<400> 354

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 355
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9-FR2
<400> 355

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

338393.TXT

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr
20 25 30

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

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

Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly
85 90 95

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

<210> 356
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.71

<400> 356

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly
100 105 110

338393.TXT

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 357
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.71
<400> 357

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 358
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.71(M)
<400> 358

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

338393.TXT

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 359
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.71(M)

<400> 359

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 360
<211> 121
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VH de anticuerpo DLL4 E9.71(L)

<400> 360

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Leu Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 361

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región VL de anticuerpo DLL4 E9.71(L)

<400> 361

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

338393.TXT

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 362
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 362

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala

<210> 363
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 363

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Arg
1 5 10 15

Val Trp Ala

<210> 364
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 364

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val
1 5 10 15

Ser Glu Ala

<210> 365
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

338393.TXT

<400> 365

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val
1 5 10 15

Ser Glu Ala

<210> 366

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 366

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 367

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 367

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 368

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de anticuerpo E9.71(M)

<400> 368

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
20 25 30

<210> 369

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

338393.TXT

<220>

<223> sitio de escisión de anticuerpo E9.71(M)-1

<400> 369

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Arg
1 5 10 15

Val Trp Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
20 25 30

<210> 370

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de anticuerpo E9.71(M)-2

<400> 370

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val
1 5 10 15

Ser Glu Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
20 25 30

<210> 371

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de anticuerpo E9.71(M)-3

<400> 371

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val
1 5 10 15

Ser Glu Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
20 25

<210> 372

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de anticuerpo E9.71(M)-4

<400> 372

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

338393.TXT

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
20 25 30

Ser

<210> 373
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sitio de escisión de anticuerpo E9.71(M)-5
<400> 373

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
20 25 30

<210> 374
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido de localización de CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X puede ser cualquier aminoácido
<400> 374

Phe Gly Xaa Gly
1

<210> 375
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido de localización de CDR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(9)
<223> X puede ser cualquier aminoácido, posiciones 2-9
<400> 375

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 376
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido de localización de CDR
<400> 376

Leu Glu Trp Ile Gly
1 5

<210> 377
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido de localización de CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X puede ser cualquier aminoácido
<400> 377

Trp Gly Xaa Gly
1



No. 12-031220- -00000-0000

Fecha: 2012-02-22 16:19:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 463

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que solicita una patente
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes.
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación grafica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐