Industria y
SUPERINTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-086819- -00000-0000
Fecha: 2014-04-23 16:32:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: **Agentes de Ligación a VEGF/DLL4 y Usos de los Mismos**

SOLICITANTE: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.**

DIRECCIÓN: **800 Chesapeake Drive, Redwood Coty, CA 94063 (US)**

APODERADO: **CARLOS R. OLARTE**

BOGOTÁ: **23 de abril de 2014**

P2014/000058

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & AS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-086819- -00000-0000
Fecha: 2014-04-23 16:32:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 56

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000058**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.**
Dirección: 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US)
Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: **Fax:**
E-mail:

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03, Bogotá
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/056886 Fecha Septiembre 24, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/044215 Fecha Marzo 28, 2013

(6) **Título (54)** **Agentes de Ligación a VEGF/DLL4 y Usos de los Mismos**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00, C12P 21/08, C07K 16/00

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Septiembre 23, 2011	61/538,454
US	Febrero 10, 2012	61/597,409
US	Agosto 24, 2012	61/692,978

(9) **Comprobante de pago No.** 14- **Fecha**

(10) **ANEXOS**

- [x] 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.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] 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.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/056886

Austin L. GURNEY
946 Diamond Street,
San Francisco, CA 94114
Estados Unidos de América

Aaron Ken SATO
1636 Albemarle Way,
Burlingame, CA 94010
Estados Unidos de América

Christopher John BOND
511 30th Avenue,
San Mateo, CA 94403
Estados Unidos de América

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0041768

Bogotá D.C., Abril 21 de 2014 - 14:02:17

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	609953610	16/04/2014	9.497.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	515.000.00	515.000.00
				$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-086819- -00000-0000

Fecha: 2014-04-23 16:32:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 16

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
2020	2014 4 23	4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: □ Traslado: □ Convenio: □

Radicador: Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-86819-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 13 ARCHIVOS:
13 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.
EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO (5)

6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

ADMI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-086819- -00000-0000
Fecha: 2014-04-23 16:32:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5 6

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión

- ☐ Indicación que se 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 el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN 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, resumen)
- ☐ 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 DE 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 gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000058**

SOLICITUD DE:

1

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.**
Dirección: 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US)
Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03, Bogotá
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/056886 Fecha Septiembre 24, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/044215 Fecha Marzo 28, 2013

6

Título (54) **Agentes de Ligación a VEGF/DLL4 y Usos de los Mismos**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00, C12P 21/08, C07K 16/00

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Septiembre 23, 2011	61/538,454
US	Febrero 10, 2012	61/597,409
US	Agosto 24, 2012	61/692,978

9

Comprobante de pago No. 14-_____ **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

[x]	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.
[x]	Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple
[ ]	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
[ ]	Declaraciones. Bajo la regla 4.17
[x]	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
[x]	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
[x]	Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
[ ]	Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
[ ]	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.
[ ]	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
[ ]	Arte final 12 x 12.
[ ]	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
[ ]	De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. Formulario PCT/IB/306
[x]	Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/056886

Austin L. GURNEY
946 Diamond Street,
San Francisco, CA 94114
Estados Unidos de América

Aaron Ken SATO
1636 Albemarle Way,
Burlingame, CA 94010
Estados Unidos de América

Christopher John BOND
511 30th Avenue,
San Mateo, CA 94403
Estados Unidos de América

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés presentado ante mí.
ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Ministerio de Justicia
Licencia 0041/1996

ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Minijusticia 1996

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARÍA DE ESTADO

Esta Apostilla solamente certifica la autenticidad de la firma y el cargo funcionario público quien firmó el documento público, y donde fuese necesario, la identidad del sello que lleve el documento público.

Esta Apostilla no certifica el contenido del documento para la cual fue otorgada.

Esta Apostilla no tiene validez dentro de los Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.

Para verificar la validez de esta Apostilla, diríjase a www.sos.ca.gov/buisness/notary/apostille-search/

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

1. País: **Estados Unidos de América**

2. Este documento público ha sido firmado por **CHERYL HERMANSEN**

3, Actuando en calidad de **Notario Público, Estado de California**

4. Lleva el sello de **Cheryl Hermansen, Notario Público, Estado de California**

CERTIFICA

5. en Sacramento, California

6. **el 20 de abril de 2011**

7. por el Secretario de Estado delegado, Estado de California

8. Número **952186**

9. Sello: (ilegible)

10. Firma: (firma ilegible) Secretario de Estado
Por (firma ilegible)

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2011 MAY 31 P 5:11
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

0 72275

ESTA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

PODER

Firma: (ilegible)
Alicia J. Hager, J.D., Ph.D.
Vicepresidente, Asuntos Legales y Director Jurídico de Patentes
OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

Fecha: 19 de abril de 2011

Ciudad, País: Redwood City, California, Estados Unidos de América

RECONOCIMIENTO

Estado de California
Condado de San Mateo
El 19 de abril de 2011, ante mi Cheryl Hermansen, Notario Público compareció Alicia J. Hager quien demostró ser la persona identificada mediante evidencia satisfactoria y quien debidamente autorizada suscribió el instrumento adjunto y que por medio de su rúbrica la entidad por quien ella actuó, suscribió dicho instrumento.

Certifico so pena de condena por falso testimonio bajo las leyes del Estado de California que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En testimonio de lo cual me suscribo y coloco el sello oficial.

(firma ilegible)

Sello: CHERYL HERMANSEN
Comisión No. 1844810
Notario Público – California
Condado de Santa Clara
Mi comisión vence el 14 de abril de 2013

Información Opcional

Fecha del documento:	19 de abril de 2011
Tipo de documento:	Poder
Número de páginas del documento:	2
Tipo de evidencia:	identificación física
Suscriptor en calidad de:	Vicepresidente y Director Jurídico de Patentes

ROBERTO M. OLARTE GARCIA
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Minijusticia 1998

LU64453
LU64454

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC

domiciled in

domiciliado en

800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 E.U.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce matters relating to Application Nos 11-014579 and 11-014588 the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Alicia J. Hager, J.D., Ph.D
Vice President, Legal Affairs and Chief Patent Counsel
OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

Date/Fecha: 19 April 2011

City,Country/Ciudad,País: Redwood City, California, United States of America

State of California

SECRETARY OF STATE

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the title of the public official who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears. This Apostille does not certify the authenticity of the underlying document for which it was issued. This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions. To verify the issuance of this Apostille, go to www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by Cheryl Hermansen*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Cheryl Hermansen, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 20th day of April 2011*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 952186*
9. *Seal/Stamp:*

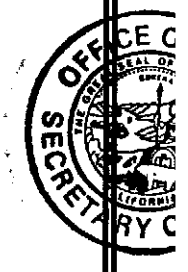


10. *Signature*

Jena Bowen

Secretary of State

BY Rudd



CHERYL HERMANSEN
COMM. #1844810
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Apr. 14, 2013

ACKNOWLEDGMENT

CHERYL HERMANSEN
COMM. #1844810
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Apr. 14, 2013

State of California
County of San Mateo } ss.

On April 19, 2011 before me, Cheryl Hermansen, Notary Public
Notary Public, personally appeared Alicia S Hager,
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signatures(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

CHERYL HERMANSEN
COMM. #1844810
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Apr. 14, 2013

Signature

(seal)

OPTIONAL INFORMATION

Date of Document 4/19/11

Type or Title of Document Power of Attorney

Number of Pages in Document 2

Document in a Foreign Language

Thumbprint of Signer

Type of Satisfactory Evidence:
- ___ Personally Known with Paper Identification
- X Paper Identification
- ___ Credible Witness(es)

CHERYL HERMANSEN
COMM. #1844810
Notary Public - California
Santa Clara County
My Comm. Expires Apr. 14, 2013

☐ Check here if no thumbprint or fingerprint is available.

Capacity of Signer:
- ___ Trustee
- ___ Power of Attorney
- ___ CEO / CFO / ~~COO~~
- X President / Vice-President / Secretary / Treasurer
- ___ Other: and Chief Patent Counsel

Other Information: ___

© 2008 Allstate Notary Preparation, Inc. - (800) 689-8456 - www.allstatenotary.com

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
28 March 2013 (28.03.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/044215 A1

(51) **International Patent Classification**:
A61K 39/00 (2006.01) ***C07K 16/00*** (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) **International Application Number**:
PCT/US2012/056886

(22) **International Filing Date**:
24 September 2012 (24.09.2012)

(25) **Filing Language**: English

(26) **Publication Language**: English

(30) **Priority Data**:
61/538,454 23 September 2011 (23.09.2011) US
61/597,409 10 February 2012 (10.02.2012) US
61/692,978 24 August 2012 (24.08.2012) US

(71) **Applicant**: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) **Inventors**: **GURNEY, Austin, L.**; 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (US). **SATO, Aaron, Ken**; 1636 Albemarle Way, Burlingame, CA 94010 (US). **BOND, Christopher, John**; 511 30th Avenue, San Mateo, CA 94403 (US).

(74) **Agents**: **CALVO, Paul, A.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox, PLLC, 1100 New York Avenue, NW, Washington, DC 20005 (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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, 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 (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

WO 2013/044215 A1

(54) **Title**: VEGF/DLL4 BINDING AGENTS AND USES THEREOF

(57) **Abstract**: The present invention relates to VEGF-binding agents, DLL4-binding agents, VEGF/DLL4 bispecific binding agents, and methods of using the agents for treating diseases such as cancer. The present invention provides antibodies that specifically bind human VEGF, antibodies that specifically bind human DLL4, and bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and/or human DLL4. The present invention further provides methods of using the agents to inhibit tumor growth. Also described are methods of treating cancer comprising administering a therapeutically effect amount of an agent or antibody of the present invention to a patient having a tumor or cancer.

VEGF/DLL4 BINDING AGENTS AND USES THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention generally relates to antibodies and other agents that bind VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, particularly anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies, as well as to methods of using the antibodies or other agents for the treatment of diseases such as cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Angiogenesis plays an important role in the pathogenesis of a number of disorders, including solid tumors and metastasis. The production of new blood vessels is essential for providing oxygen and nutrients for the growth and spread of a tumor, and therefore angiogenesis is a good target for cancer therapeutics.

[0003] Angiogenesis involves a family of proteins acting as angiogenic activators, including vascular endothelial growth factor (VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, and their respective receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3). VEGF-A, also referred to as VEGF or vascular permeability factor (VPF), exists in several isoforms that arise from alternative splicing of mRNA of a single VEGF gene, with $VEGF_{165}$ being the most biologically relevant isoform.

[0004] Anti-VEGF antibodies have been shown to suppress the growth of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. A humanized anti-VEGF monoclonal antibody, bevacizumab (AVASTIN) has been developed and approved in the United States as a cancer therapeutic.

[0005] The Notch signaling pathway is a universally conserved signal transduction system. It is involved in cell fate determination during development including embryonic pattern formation and post-embryonic tissue maintenance. In addition, Notch signaling has been identified as a critical factor in the maintenance of hematopoietic stem cells.

[0006] The Notch pathway has been linked to the pathogenesis of both hematologic and solid tumors and cancers. Numerous cellular functions and microenvironmental cues associated with tumorigenesis have been shown to be modulated by Notch pathway signaling, including cell proliferation, apoptosis, adhesion, and angiogenesis (Leong et al., 2006, *Blood*, 107:2223-2233). In addition, Notch receptors and/or Notch ligands have been shown to play potential oncogenic roles in a number of human cancers, including acute myelogenous leukemia, B cell chronic lymphocytic leukemia, Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, T-cell acute lymphoblastic leukemia, brain cancer, breast cancer, cervical cancer, colon cancer, lung cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, and skin cancer. (Leong et al., 2006, *Blood*, 107:2223-2233).

[0007] Delta-like 4 ligand (DLL4) is an important component of the Notch pathway and has been identified as a target for cancer therapy. DLL4 is a Notch ligand, characterized by an N-terminal domain,

a Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) domain and tandem EGF-like repeats within the extracellular domain. It has been reported that DLL4 is induced by VEGF and that DLL4 may act as a negative feedback regulator for vascular proliferation.

[0008] Anti-DLL4 antibodies have been shown to enhance angiogenic sprouting and branching which leads to non-productive angiogenesis and decreased tumor growth (Noguera-Troise et al., 2006, *Nature*, 444:1032-1037). In addition, an anti-DLL4 antibody, 21M18, has been shown to inhibit tumor growth and reduce the frequency of cancer stem cells in xenograft tumor models (Hoey et al., 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-177; U.S. Patent No. 7,750,124).

[0009] Although there have been significant strides in development of monoclonal antibodies for use in cancer treatments, there is still great potential for further improvements. One class of antibody molecules with the promise of enhanced potency and/or reduced side effects (e.g., toxicity) is bispecific antibodies.

[0010] Early bispecific molecules were mainly generated using chemical cross-linking of two antibodies, or were hybrid hybridomas or "quadromas". One success of the quadroma format is triomabs, which are mouse/rat combinations that demonstrate a preferential species-specific heavy/light chain pairing. More recently, advances in antibody engineering have provided a wide variety of new antibody formats, including, but not limited to, tandem scFv (bi-scFv), diabodies, tandem diabodies (tetra-bodies), single chain diabodies, and dual variable domain antibodies.

[0011] It is one of the objectives of the present invention to provide improved molecules for cancer treatment, particularly bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and human DLL4.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides binding agents, such as antibodies, that bind VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4 (VEGF/DLL4-binding agents), as well as compositions, such as pharmaceutical compositions, comprising the binding agents. Binding agents that bind VEGF or DLL4, as well as at least one additional antigen or target, and pharmaceutical compositions of such binding agents, are also provided. In certain embodiments, the binding agents are novel polypeptides, such as antibodies, antibody fragments, and other polypeptides related to such antibodies. In certain embodiments, the binding agents are antibodies that specifically bind human VEGF. In some embodiments, the binding agents are antibodies that specifically bind human DLL4. In some embodiments, the binding agents are bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and human DLL4. The invention further provides methods of inhibiting the growth of a tumor by administering the binding agents to a subject with a tumor. The invention further provides methods of treating cancer by administering the binding agents to a subject in need thereof. In some embodiments, the methods of treating cancer or inhibiting tumor growth comprise targeting cancer stem cells with the binding agents. In certain embodiments, the methods comprise reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, reducing the number of cancer stem cells in a

tumor, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or reducing the tumorigenicity of a tumor by reducing the number or frequency of cancer stem cells in the tumor.

[0013] In one aspect, the invention provides a binding agent, such as an antibody, that specifically binds human VEGF. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of VEGF to VEGFR-1 and/or VEGFR-2. In some embodiments, the binding agent modulates angiogenesis. In certain embodiments, the antibody or other binding agent further specifically binds to and/or inhibits human DLL4 in addition to human VEGF.

[0014] In some embodiments, the binding agent is an antibody which comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0015] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent comprises a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent comprises a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0016] In some embodiments, the binding agent is antibody 219R45, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, or 219R45-MB-21R83.

[0017] In another aspect, the invention provides a binding agent, such as an antibody, that specifically binds human DLL4. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of DLL4 to Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4. In some embodiments, the binding agent inhibits Notch signaling. In some embodiments, the binding agent promotes unproductive angiogenesis. In certain embodiments, the antibody or other binding agent further specifically binds to and/or inhibits human VEGF in addition to human DLL4.

[0018] In some embodiments, the binding agent is an antibody that binds human DLL4 and comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid ,

and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0019] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and/or a light chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:10; and a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0020] In some embodiments, the binding agent is antibody 21R79 or antibody 219R45-MB-21R79.

[0021] In some embodiments, the binding agent is an antibody which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0022] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and/or a light chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:58; and a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0023] In some embodiments, the binding agent is antibody 21R75 or antibody 219R45-MB-21R75.

[0024] In some embodiments, the binding agent is an antibody which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0025] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain

embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:64; and a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0026] In some embodiments, the binding agent is antibody 21R83 or antibody 219R45-MB-21R83.

[0027] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the binding agent is a bispecific antibody. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF and a second target. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human DLL4 and a second target. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds both human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody modulates angiogenesis. In certain embodiments, the bispecific antibody inhibits Notch signaling. In some embodiments, the bispecific antibody modulates angiogenesis and inhibits Notch signaling. In some embodiments, the bispecific antibody reduces the number of frequency of cancer stem cells. In certain embodiments, the bispecific antibody comprises two identical light chains. In certain embodiments the bispecific antibody is an IgG antibody (e.g., IgG2).

[0028] In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0029] In certain embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein

the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0030] In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS

(SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the a bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0031] In some embodiments, the bispecific antibody that specifically binds human VEGF, and comprises: a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11, and/or a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF, and comprises: a heavy chain

variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, and/or a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0032] In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human DLL4, and comprises: a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human DLL4, and comprises: a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0033] In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF and human DLL4, and comprises: (a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0034] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1 nM and about 1.0 nM and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM. In certain embodiments, the bispecific antibody comprises two identical light chains.

[0035] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

[0036] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the binding agent or antibody is isolated.

[0037] In another aspect, the invention provides a polypeptide selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In some embodiments, the polypeptide is isolated. In certain embodiments, the polypeptide is substantially pure. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody or part of an antibody, such as an antibody fragment.

[0038] In another aspect, the invention provides isolated polynucleotide molecules comprising a polynucleotide that encodes the binding agents and/or polypeptides of each of the aforementioned aspects, as well as other aspects and/or embodiments described herein. In some embodiments, the polynucleotide comprises a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, and SEQ ID NO:74. The invention further provides expression vectors that comprise the polynucleotides, as well as cells that comprise the expression vectors and/or the polynucleotides. In some embodiments, the cell is a prokaryotic cell or a eukaryotic cell.

[0039] In other aspects, the invention provides methods of inhibiting growth of a tumor, comprising contacting the tumor with an effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0040] In another aspect, the invention provides a method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0041] In another aspect, the invention provides a method of modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0042] In another aspect, the invention provides a method of reducing the tumorigenicity of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or

other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0043] In another aspect, the invention provides a method of reducing the tumorigenicity of a tumor in a subject by reducing the frequency of cancer stem cells in the tumor, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0044] In other aspects, the invention provides methods of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0045] Pharmaceutical compositions comprising a binding agent (e.g., antibody) described herein and a pharmaceutically acceptable carrier are further provided, as are cell lines that express and/or produce the binding agents. Methods of treating cancer and/or inhibiting tumor growth in a subject (e.g., a human) comprising administering to the subject an effective amount of a composition comprising the binding agents are also provided.

[0046] Where aspects or embodiments of the invention are described in terms of a Markush group or other grouping of alternatives, the present invention encompasses not only the entire group listed as a whole, but also each member of the group individually and all possible subgroups of the main group, and also the main group absent one or more of the group members. The present invention also envisages the explicit exclusion of one or more of any of the group members in the claimed invention.

BRIEF DESCRIPTIONS OF THE DRAWINGS

[0047] Figure 1. 1A) Heavy chain and light chain CDRs of anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21M79, 219R45-MB-21M75, and 219R45-MB-21M83; 1B) Heavy chain and light chain variable region SEQ ID NOs; 1C) Heavy chain and light chain SEQ ID NOs.

[0048] Figure 2. HTRF assay for simultaneous binding of bispecific antibodies to human VEGF and human DLL4. Results are reported in Relative Fluorescence Units (RFU), which represent the ratio of the relative fluorescence intensity at 665nm to the relative fluorescence intensity at 620nm. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 219R45 plus 21M18 (-▲-); 219R45 plus 21R79 (-□-); 219R45 (-▼-); 21M18 (-◊-); 21R79 (-○-); control antibody LZ-1 (-Δ-).

[0049] Figure 3. Inhibition of VEGF-induced HUVEC proliferation by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. Fluorescence intensity is read using an excitation wavelength of 530nm and an emission wavelength of 590. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-▲-); 219R45 (-■-); Medium with no VEGF (-◊-).

[0050] Figure 4. Inhibition of DLL4-induced Notch signaling by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. Luciferase activity was measured using a dual luciferase assay kit with firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 21M18 (-○-); 21R79 (-□-).

[0051] Figure 5. Inhibition of colon tumor growth *in vivo* by an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody. OMP-C8 colon tumor cells were injected subcutaneously into a human skin graft in NOD/SCID mice. Mice were treated with control antibody (-■-), anti-hDLL4 antibody 21M18 (-▲-), anti-VEGF antibody bevacizumab (-○-), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 (-▼-). Data is shown as tumor volume (photons/sec) over days post-treatment. Antibodies were administered intraperitoneally at a dose of 25mg/kg once a week.

[0052] Figure 6. Tumorigenicity of pancreatic tumor cells after treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. OMP-PN8 tumor cells from mice treated with control antibody, anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 or 219R45-MB-21R79 with or without gemcitabine were processed to single cell suspensions, and serially transplanted into mice. 90 cells from each treatment group were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow with no treatment. Data is shown as tumor volume (mm^3) on day 55. Tumor frequency is shown as number of tumors over total number of mice injected in each group.

[0053] Figure 7. Bispecific antibody ELISA. Bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 were diluted in blocking buffer (1x PBS, 0.1% gelatin, 0.1% Polysorbate-20, pH 7.4) containing 2μg/ml biotin-DLL4-hFc. The antibodies were serially diluted 3-fold from 500ng/ml to 0.008ng/ml. The antibody samples were incubated for 2 hours in blocking buffer containing the biotin-DLL4-hFc. After incubation, the antibody samples were transferred to a VEGF-coated assay plate (100 ul/well) and incubated for 2 hours. Streptavidin-HRP was added to each well and incubated for 1 hr. TMB substrate was added to the wells with a 10 minute color development and the reaction was stopped with 2M sulfuric acid. Absorbance was read at 450–650nm and the data analyzed using the 4-parameter fit within the Softmax Pro analysis program.

[0054] Figure 8. Imaged capillary isoelectric focusing of anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies.

[0055] Figure 9. Inhibition of colon tumor growth by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies in tumor recurrence model. OMP-C8 colon tumor cells were injected subcutaneously in NOD/SCID mice. Mice were treated with control antibody (-■-), anti-hDLL4 antibody 21M18 (-●-), anti-VEGF antibody bevacizumab (-▲-), a combination of 21M18 and bevacizumab (-▼-), anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 (-◊-), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79 (-○-), all in combination with irinotecan. Antibodies 21M18 and bevacizumab were administered intraperitoneally at a dose of 7.5mg/kg once a week, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and

219R45-MB-21R79 were administered intraperitoneally at a dose of 15mg/kg once a week, and irinotecan was administered for the first 4 weeks at a dose of 45mg/kg. Data are shown as tumor volume (mm^3) over days post-treatment.

[0056] Figure 10. Tumorigenicity of OMP-C3 colon tumor cells after treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. Tumors from mice treated with control antibody, anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, a combination of 21M18 and bevacizumab, or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 or 219R45-MB-21R79 with or without irinotecan were processed to single cell suspensions, and serially transplanted into mice. 150 cells from each treatment group were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow with no treatment. Data are shown as tumor volume (mm^3) on day 68.

[0057] Figure 11. Inhibition of colon tumor growth *in vivo* by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. OMP-C8 colon tumor cells were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. Mice were treated with control antibody (-■-), anti-VEGF antibody bevacizumab (-▲-), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 (-◊-), 219R45-MB-21R75 (-●-), 219R45-MB-21R79 (-○-), or 219R45-MB-21R83 (-▼-). Mice were treated with antibodies as single agents (Fig. 10A) or in combination with irinotecan (Fig. 10B). Antibodies were administered intraperitoneally at a dose of 15mg/kg once a week and irinotecan at a dose of 7.5mg/kg one a week. Data are shown as tumor volume (mm^3) over days post-treatment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0058] The present invention provides novel binding agents, including but not limited to polypeptides such as antibodies, that bind VEGF and/or DLL4 (e.g., a VEGF/DLL4 binding agent). Related polypeptides and polynucleotides, compositions comprising the VEGF/DLL4-binding agents, and methods of making the VEGF/DLL4-binding agents are also provided. Methods of using the novel VEGF/DLL4-binding agents, such as methods of inhibiting tumor growth, methods of treating cancer, methods of reducing tumorigenicity of a tumor, methods of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, and/or methods of modulating angiogenesis, are further provided.

[0059] A monoclonal antibody that specifically binds human VEGF has been identified, 219R45. This antibody has a binding affinity for human VEGF of about 0.67nM, and a binding affinity for mouse VEGF of about 23nM. Several monoclonal antibodies that specifically bind human DLL4 have been identified, 21R79, 21R75 and 21R83. Antibody 21R79 has a binding affinity for human DLL4 of less than 0.1nM. Bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and human DLL4 have been produced, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 (CDR sequences in Figure 1). As used herein, the "MB" within an antibody name refers to "monovalent/bispecific". Bispecific antibody 219R45-MB-21M18 has a binding affinity for human

VEGF of less than 1.0nM and a binding affinity for human DLL4 of about 16nM. Bispecific antibody 219R45-MB-21R79 has a binding affinity for human VEGF of less than 1.0nM and a binding affinity for human DLL4 of less than 1.0nM. Bispecific antibody 219R45-MB-21R75 has a binding affinity for human DLL4 of about 5nM, while bispecific antibody 219R45-MB-21R83 has a binding affinity for human DLL4 of about 1nM. Bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 bind mouse VEGF (Example 1, Table 3). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies bind human VEGF and human DLL4 simultaneously (Example 2, Figure 2). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit VEGF-induced proliferation of HUVEC cells (Example 3, Figure 3). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit DLL4-induced Notch signaling (Example 4, Figure 4). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit tumor growth (Examples 5, 9, 11 and Figures 5, 9, 11). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit tumorigenicity (Examples 6 and 10 and Figures 6, 10). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies bind both VEGF and DLL4 in a bispecific ELISA (Example 7, Figure 7). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies are isolated and purified to a product comprising at least 90% heterodimeric antibody (Example 8, Table 7).

I. Definitions

[0060] To facilitate an understanding of the present invention, a number of terms and phrases are defined below.

[0061] The term "antibody" as used herein refers to an immunoglobulin molecule that recognizes and specifically binds a target, such as a protein, polypeptide, peptide, carbohydrate, polynucleotide, lipid, or combinations of the foregoing, through at least one antigen recognition site within the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses intact polyclonal antibodies, intact monoclonal antibodies, single chain antibodies, antibody fragments (such as Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments), single chain Fv (scFv) antibodies, multispecific antibodies such as bispecific antibodies, monospecific antibodies, monovalent antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, human antibodies, fusion proteins comprising an antigen-binding site of an antibody, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site (i.e., antigen-binding site) as long as the antibodies exhibit the desired biological activity. An antibody can be any of the five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, or subclasses (isotypes) thereof (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, and IgA2), based on the identity of their heavy chain constant domains referred to as alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The different classes of immunoglobulins have different and well-known subunit structures and three-dimensional configurations. Antibodies can be naked or conjugated to other molecules, including but not limited to, toxins and radioisotopes.

[0062] The term "antibody fragment" refers to a portion of an intact antibody and refers to the antigenic determining variable regions of an intact antibody. Examples of antibody fragments include, but are not

limited to, Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments, linear antibodies, single chain antibodies, and multispecific antibodies formed from antibody fragments. "Antibody fragment" as used herein comprises an antigen-binding site or epitope-binding site.

[0063] The term "variable region" of an antibody refers to the variable region of an antibody light chain, or the variable region of an antibody heavy chain, either alone or in combination. The variable regions of the heavy and light chains each consist of four framework regions (FR) connected by three complementarity determining regions (CDRs), also known as "hypervariable regions". The CDRs in each chain are held together in close proximity by the framework regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of the antibody. There are at least two techniques for determining CDRs: (1) an approach based on cross-species sequence variability (i.e., Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, *5th Edition*, National Institutes of Health, Bethesda, MD), and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). In addition, combinations of these two approaches are sometimes used in the art to determine CDRs.

[0064] The term "monoclonal antibody" as used herein refers to a homogeneous antibody population involved in the highly specific recognition and binding of a single antigenic determinant or epitope. This is in contrast to polyclonal antibodies that typically include a mixture of different antibodies directed against a variety of different antigenic determinants. The term "monoclonal antibody" encompasses both intact and full-length monoclonal antibodies as well as antibody fragments (e.g., Fab, Fab', F(ab')2, Fv), single chain (scFv) antibodies, fusion proteins comprising an antibody portion, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site (antigen-binding site). Furthermore, "monoclonal antibody" refers to such antibodies made by any number of techniques, including but not limited to, hybridoma production, phage selection, recombinant expression, and transgenic animals.

[0065] The term "humanized antibody" as used herein refers to forms of non-human (e.g., murine) antibodies that are specific immunoglobulin chains, chimeric immunoglobulins, or fragments thereof that contain minimal non-human sequences. Typically, humanized antibodies are human immunoglobulins in which residues of the CDRs are replaced by residues from the CDRs of a non-human species (e.g., mouse, rat, rabbit, or hamster) that have the desired specificity, affinity, and/or binding capability (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). In some instances, the Fv framework region residues of a human immunoglobulin are replaced with the corresponding residues in an antibody from a non-human species that has the desired specificity, affinity, and/or binding capability. The humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residues either in the Fv framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or binding capability. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically

two or three, variable domains containing all or substantially all of the CDRs that correspond to the non-human immunoglobulin whereas all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Examples of methods used to generate humanized antibodies are described in, for example, U.S. Patent 5,225,539.

[0066] The term "human antibody" as used herein refers to an antibody produced by a human or an antibody having an amino acid sequence corresponding to an antibody produced by a human. A human antibody may be made using any of the techniques known in the art. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human CDRs.

[0067] The term "chimeric antibody" as used herein refers to an antibody wherein the amino acid sequence of the immunoglobulin molecule is derived from two or more species. Typically, the variable region of both light and heavy chains corresponds to the variable region of antibodies derived from one species of mammals (e.g., mouse, rat, rabbit, etc.) with the desired specificity, affinity, and/or binding capability, while the constant regions correspond to sequences in antibodies derived from another species (usually human).

[0068] The phrase "affinity-matured antibody" as used herein refers to an antibody with one or more alterations in one or more CDRs thereof that result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody that does not possess those alterations(s). The definition also includes alterations in non-CDR residues made in conjunction with alterations to CDR residues. Preferred affinity-matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity-matured antibodies are produced by procedures known in the art. For example, Marks et al., 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by Barbas et al., 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier et al., 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.,* 154:3310-9; and Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.,* 226:889-896. Site-directed mutagenesis may also be used to obtain affinity-matured antibodies.

[0069] The terms "epitope" and "antigenic determinant" are used interchangeably herein and refer to that portion of an antigen capable of being recognized and specifically bound by a particular antibody. When the antigen is a polypeptide, epitopes can be formed both from contiguous amino acids and noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids (also referred to as linear epitopes) are typically retained upon protein denaturing, whereas epitopes formed by tertiary folding (also referred to as conformational epitopes) are typically lost upon protein denaturing. An epitope typically includes at least 3, and more usually, at least 5 or 8-10 amino acids in a unique spatial conformation.

[0070] The terms "heteromultimeric molecule" or "heteromultimer" or "heteromultimeric complex" or "heteromultimeric polypeptide" are used interchangeably herein to refer to a molecule comprising at least a first polypeptide and a second polypeptide, wherein the second polypeptide differs in amino acid sequence from the first polypeptide by at least one amino acid residue. The heteromultimeric molecule can comprise a "heterodimer" formed by the first and second polypeptide or can form higher order tertiary structures where additional polypeptides are present.

[0071] The terms "antagonist" and "antagonistic" as used herein refer to any molecule that partially or fully blocks, inhibits, reduces, or neutralizes a biological activity of a target and/or signaling pathway (e.g., the Notch pathway). The term "antagonist" is used herein to include any molecule that partially or fully blocks, inhibits, reduces, or neutralizes the activity of a protein. Suitable antagonist molecules specifically include, but are not limited to, antagonist antibodies or antibody fragments.

[0072] The terms "modulation" and "modulate" as used herein refer to a change or an alteration in a biological activity. Modulation includes, but is not limited to, stimulating or inhibiting an activity. Modulation may be an increase or a decrease in activity (e.g., a decrease in angiogenesis or an increase in angiogenesis), a change in binding characteristics, or any other change in the biological, functional, or immunological properties associated with the activity of a protein, pathway, or other biological point of interest.

[0073] The terms "selectively binds" or "specifically binds" mean that a binding agent or an antibody reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration, with greater affinity, or with some combination of the above to the epitope, protein, or target molecule than with alternative substances, including unrelated proteins. In certain embodiments "specifically binds" means, for instance, that an antibody binds a protein with a K_D of about 0.1mM or less, but more usually less than about 1μM. In certain embodiments, "specifically binds" means that an antibody binds a target at times with a K_D of at least about 0.1μM or less, at other times at least about 0.01μM or less, and at other times at least about 1nM or less. Because of the sequence identity between homologous proteins in different species, specific binding can include an antibody that recognizes a protein in more than one species (e.g., human VEGF and mouse VEGF). Likewise, because of homology within certain regions of polypeptide sequences of different proteins, specific binding can include an antibody (or other polypeptide or binding agent) that recognizes more than one protein (e.g., human VEGF-A and human VEGF-B). It is understood that, in certain embodiments, an antibody or binding moiety that specifically binds a first target may or may not specifically bind a second target. As such, "specific binding" does not necessarily require (although it can include) exclusive binding, i.e. binding to a single target. Thus, an antibody may, in certain embodiments, specifically bind more than one target. In certain embodiments, multiple targets may be bound by the same antigen-binding site on the antibody. For example, an antibody may, in certain instances, comprise two identical antigen-binding sites, each of which specifically binds the same epitope on two or more

proteins. In certain alternative embodiments, an antibody may be multispecific and comprise at least two antigen-binding sites with differing specificities. By way of non-limiting example, a bispecific antibody may comprise one antigen-binding site that recognizes an epitope on one protein (e.g., human VEGF) and further comprise a second, different antigen-binding site that recognizes a different epitope on a second protein (e.g., human DLL4). Generally, but not necessarily, reference to binding means specific binding.

[0074] The terms "polypeptide" and "peptide" and "protein" are used interchangeably herein and refer to polymers of amino acids of any length. The polymer may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and it may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid polymer that has been modified naturally or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids), as well as other modifications known in the art. It is understood that, because the polypeptides of this invention may be based upon antibodies, in certain embodiments, the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

[0075] The terms "polynucleotide" and "nucleic acid" are used interchangeably herein and refer to polymers of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a polymer by DNA or RNA polymerase.

[0076] "Conditions of high stringency" may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 15mM sodium chloride/1.5mM sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 in 5x SSC (0.75M NaCl, 75mM sodium citrate) at 42°C; or (3) employ during hybridization 50% formamide in 5x SSC, 50mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2x SSC and 50% formamide, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1x SSC containing EDTA at 55°C.

[0077] The terms "identical" or percent "identity" in the context of two or more nucleic acids or polypeptides, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of nucleotides or amino acid residues that are the same, when compared and aligned (introducing gaps, if necessary) for maximum correspondence, not considering any conservative amino acid substitutions as part of the sequence identity. The percent identity may be measured using sequence comparison software or algorithms or by visual inspection. Various algorithms and software that may be used to obtain alignments of amino acid or nucleotide sequences are well-known in the art. These

include, but are not limited to, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, and variations thereof. In some embodiments, two nucleic acids or polypeptides of the invention are substantially identical, meaning they have at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, and in some embodiments at least 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nucleotide or amino acid residue identity, when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using a sequence comparison algorithm or by visual inspection. In some embodiments, identity exists over a region of the sequences that is at least about 10, at least about 20, at least about 40-60 residues, at least about 60-80 residues in length or any integral value therebetween. In some embodiments, identity exists over a longer region than 60-80 residues, such as at least about 80-100 residues, and in some embodiments the sequences are substantially identical over the full length of the sequences being compared, such as the coding region of a nucleotide sequence.

[0078] A "conservative amino acid substitution" is one in which one amino acid residue is replaced with another amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art, including basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). For example, substitution of a phenylalanine for a tyrosine is a conservative substitution. Preferably, conservative substitutions in the sequences of the polypeptides and antibodies of the invention do not abrogate the binding of the polypeptide or antibody containing the amino acid sequence, to the antigen to which the polypeptide or antibody binds. Methods of identifying nucleotide and amino acid conservative substitutions which do not eliminate antigen binding are well-known in the art.

[0079] The term "vector" as used herein means a construct, which is capable of delivering, and usually expressing, one or more gene(s) or sequence(s) of interest in a host cell. Examples of vectors include, but are not limited to, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, plasmid, cosmid, or phage vectors, DNA or RNA expression vectors associated with cationic condensing agents, and DNA or RNA expression vectors encapsulated in liposomes.

[0080] A polypeptide, antibody, polynucleotide, vector, cell, or composition which is "isolated" is a polypeptide, antibody, polynucleotide, vector, cell, or composition which is in a form not found in nature. Isolated polypeptides, antibodies, polynucleotides, vectors, cells, or compositions include those which have been purified to a degree that they are no longer in a form in which they are found in nature. In some embodiments, a polypeptide, antibody, polynucleotide, vector, cell, or composition which is isolated is substantially pure.

[0081] The term "substantially pure" as used herein refers to material which is at least 50% pure (i.e., free from contaminants), at least 90% pure, at least 95% pure, at least 98% pure, or at least 99% pure.

[0082] The terms "cancer" and "cancerous" as used herein refer to or describe the physiological condition in mammals in which a population of cells are characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, blastoma, sarcoma, and hematologic cancers such as lymphoma and leukemia.

[0083] The terms "tumor" and "neoplasm" as used herein refer to any mass of tissue that results from excessive cell growth or proliferation, either benign (noncancerous) or malignant (cancerous) including pre-cancerous lesions.

[0084] The term "metastasis" as used herein refers to the process by which a cancer spreads or transfers from the site of origin to other regions of the body with the development of a similar cancerous lesion at a new location. A "metastatic" or "metastasizing" cell is one that loses adhesive contacts with neighboring cells and migrates via the bloodstream or lymph from the primary site of disease to invade neighboring body structures.

[0085] The terms "cancer stem cell" and "CSC" and "tumor stem cell" and "tumor initiating cell" are used interchangeably herein and refer to cells from a cancer or tumor that: (1) have extensive proliferative capacity; 2) are capable of asymmetric cell division to generate one or more types of differentiated cell progeny wherein the differentiated cells have reduced proliferative or developmental potential; and (3) are capable of symmetric cell divisions for self-renewal or self-maintenance. These properties confer on the cancer stem cells the ability to form or establish a tumor or cancer upon serial transplantation into an immunocompromised host (e.g., a mouse) compared to the majority of tumor cells that fail to form tumors. Cancer stem cells undergo self-renewal versus differentiation in a chaotic manner to form tumors with abnormal cell types that can change over time as mutations occur.

[0086] The terms "cancer cell" and "tumor cell" refer to the total population of cells derived from a cancer or tumor or pre-cancerous lesion, including both non-tumorigenic cells, which comprise the bulk of the cancer cell population, and tumorigenic stem cells (cancer stem cells). As used herein, the terms "cancer cell" or "tumor cell" will be modified by the term "non-tumorigenic" when referring solely to those cells lacking the capacity to renew and differentiate to distinguish those tumor cells from cancer stem cells.

[0087] The term "tumorigenic" as used herein refers to the functional features of a cancer stem cell including the properties of self-renewal (giving rise to additional tumorigenic cancer stem cells) and proliferation to generate all other tumor cells (giving rise to differentiated and thus non-tumorigenic tumor cells).

[0088] The term "tumorigenicity" as used herein refers to the ability of a random sample of cells from the tumor to form palpable tumors upon serial transplantation into immunocompromised hosts (e.g., mice).

This definition also includes enriched and/or isolated populations of cancer stem cells that form palpable tumors upon serial transplantation into immunocompromised hosts (e.g., mice).

[0089] The term "subject" refers to any animal (e.g., a mammal), including, but not limited to, humans, non-human primates, canines, felines, rodents, and the like, which is to be the recipient of a particular treatment. Typically, the terms "subject" and "patient" are used interchangeably herein in reference to a human subject.

[0090] The term "pharmaceutically acceptable" refers to a product or compound approved (or approvable) by a regulatory agency of the Federal government or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans.

[0091] The terms "pharmaceutically acceptable excipient, carrier or adjuvant" or "acceptable pharmaceutical carrier" refer to an excipient, carrier or adjuvant that can be administered to a subject, together with at least one binding agent (e.g., an antibody) of the present disclosure, and which does not destroy the activity of the binding agent. The excipient, carrier or adjuvant should be nontoxic when administered with a binding agent in doses sufficient to deliver a therapeutic effect.

[0092] The terms "effective amount" or "therapeutically effective amount" or "therapeutic effect" refer to an amount of a binding agent, an antibody, polypeptide, polynucleotide, small organic molecule, or other drug effective to "treat" a disease or disorder in a subject or mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of a drug (e.g., an antibody) has a therapeutic effect and as such can reduce the number of cancer cells; decrease tumorigenicity, tumorigenic frequency or tumorigenic capacity; reduce the number or frequency of cancer stem cells; reduce the tumor size; reduce the cancer cell population; inhibit and/or stop cancer cell infiltration into peripheral organs including, for example, the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibit and/or stop tumor or cancer cell metastasis; inhibit and/or stop tumor or cancer cell growth; relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer; reduce morbidity and mortality; improve quality of life; or a combination of such effects. To the extent the agent, for example an antibody, prevents growth and/or kills existing cancer cells, it can be referred to as cytostatic and/or cytotoxic.

[0093] The terms "treating" or "treatment" or "to treat" or "alleviating" or "to alleviate" refer to both 1) therapeutic measures that cure, slow down, lessen symptoms of, and/or halt progression of a diagnosed pathologic condition or disorder and 2) prophylactic or preventative measures that prevent or slow the development of a targeted pathologic condition or disorder. Thus those in need of treatment include those already with the disorder; those prone to have the disorder; and those in whom the disorder is to be prevented. In some embodiments, a subject is successfully "treated" according to the methods of the present invention if the patient shows one or more of the following: a reduction in the number of or complete absence of cancer cells; a reduction in the tumor size; inhibition of or an absence of cancer cell infiltration into peripheral organs including the spread of cancer cells into soft tissue and bone; inhibition

of or an absence of tumor or cancer cell metastasis; inhibition or an absence of cancer growth; relief of one or more symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality; improvement in quality of life; reduction in tumorigenicity; reduction in the number or frequency of cancer stem cells; or some combination of effects.

[0094] As used in the present disclosure and claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural forms unless the context clearly dictates otherwise.

[0095] It is understood that wherever embodiments are described herein with the language "comprising" otherwise analogous embodiments described in terms of "consisting of" and/or "consisting essentially of" are also provided. It is also understood that wherever embodiments are described herein with the language "consisting essentially of" otherwise analogous embodiments described in terms of "consisting of" are also provided.

[0096] The term "and/or" as used in a phrase such as "A and/or B" herein is intended to include both A and B; A or B; A (alone); and B (alone). Likewise, the term "and/or" as used in a phrase such as "A, B, and/or C" is intended to encompass each of the following embodiments: A, B, and C; A, B, or C; A or C; A or B; B or C; A and C; A and B; B and C; A (alone); B (alone); and C (alone).

II. Antibodies

[0097] The present invention provides agents that specifically bind human VEGF proteins and/or human DLL4 proteins. These agents are referred to herein as "VEGF/DLL4-binding agents". The phrase "VEGF/DLL4-binding agent" encompasses agents that bind only VEGF, agents that bind only DLL4, and bispecific agents that bind both VEGF and DLL4. In certain embodiments, in addition to specifically binding VEGF and/or DLL4, the VEGF/DLL4-binding agents further specifically bind at least one additional target or antigen. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a polypeptide. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent specifically binds human VEGF. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent specifically binds human DLL4. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4. The full-length amino acid (aa) sequences for human VEGF (VEGF-A) and human DLL4 are known in the art and are provided herein as SEQ ID NO:27 (VEGF) and SEQ ID NO:23 (DLL4).

[0098] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a dissociation constant (K_D) of about 1μM or less, about 100nM or less, about 40nM or less, about 20nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a K_D of about 20nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or

DLL4 with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a K_D of about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds both human VEGF and mouse VEGF with a K_D of about 100nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds both human VEGF and mouse VEGF with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds both human DLL4 and mouse DLL4 with a K_D of about 100nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds both human DLL4 and mouse DLL4 with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, the dissociation constant of the binding agent (e.g., an antibody) to VEGF is the dissociation constant determined using a VEGF fusion protein comprising at least a portion of VEGF immobilized on a Biacore chip. In some embodiments, the dissociation constant of the binding agent (e.g., an antibody) to DLL4 is the dissociation constant determined using a DLL4-fusion protein comprising at least a portion of DLL4 immobilized on a Biacore chip.

[0099] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first antigen-binding site that specifically binds VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds DLL4. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 100nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 20nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, the affinity of one of the antigen-binding sites may be weaker than the affinity of the other antigen-binding site. For example, the K_D of one antigen binding site may be about 1nM and the K_D of the second antigen-binding site may be about 10nM. In some embodiments, the difference in affinity between the two antigen-binding sites may be about 2-fold or more, about 3-fold or more, about 5-fold or more, about 8-fold or more, about 10-fold or more, about 15-fold or more, about 20-fold or more, about 30-fold or more, about 50-fold or more, or about 100-fold or more. Modulation of the affinities of the two antigen-binding sites may affect the biological activity of the bispecific antibody. For example, decreasing the affinity of the antigen-binding site for DLL4 or VEGF, may have a desirable effect, for example decreased toxicity of the binding agent or increased therapeutic index.

[0100] By way of non-limiting example, the bispecific antibody may comprise (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1 nM and about 1.0 nM, and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM, between about 0.5nM and about 20nM, between about 1.0 nM and 10nM. In certain embodiments, the bispecific antibody comprises two identical light chains.

[0101] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds VEGF and/or DLL4 with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of about 1μM or less, about 100nM or less, about 40nM or less, about 20nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds VEGF and/or DLL4 with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of about 1μM or less, about 100nM or less, about 40nM or less, about 20nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less.

[0102] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody. In some embodiments, the antibody is a recombinant antibody. In some embodiments, the antibody is a monoclonal antibody. In some embodiments, the antibody is a chimeric antibody. In some embodiments, the antibody is a humanized antibody. In some embodiments, the antibody is a human antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgA, IgD, IgE, IgG, or IgM antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgG1 antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgG2 antibody. In certain embodiments, the antibody is an antibody fragment comprising an antigen-binding site. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody. In some embodiments, the antibody is monovalent, monospecific, bivalent, or multispecific. In some embodiments, the antibody is conjugated to a cytotoxic moiety. In some embodiments, the antibody is isolated. In some embodiments, the antibody is substantially pure.

[0103] The VEGF/DLL4-binding agents (e.g., antibodies) of the present invention can be assayed for specific binding by any method known in the art. The immunoassays which can be used include, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as Biacore analysis, FACS analysis, immunofluorescence, immunocytochemistry, Western blot analysis, radioimmunoassay, ELISA, "sandwich" immunoassay, immunoprecipitation assay, precipitation reaction, gel diffusion precipitin reaction, immunodiffusion assay, agglutination assay, complement-fixation assay, immunoradiometric assay, fluorescent immunoassay, homogeneous time-resolved fluorescence assay (HTRF), and protein A immunoassay. Such assays are routine and well-known in the art (see, e.g., Ausubel et al., Editors, 1994-present, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY).

[0104] For example, the specific binding of an antibody to human VEGF and/or human DLL4 may be determined using ELISA. An ELISA assay comprises preparing antigen, coating wells of a 96 well microtiter plate with antigen, adding the antibody or other binding agent conjugated to a detectable compound such as an enzymatic substrate (e.g. horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) to the well, incubating for a period of time, and detecting the presence of the binding agent bound to the antigen. In some embodiments, the binding agent or antibody is not conjugated to a detectable compound, but instead a second antibody that recognizes the binding agent or antibody (e.g., an anti-Fc antibody) and is conjugated to a detectable compound is added to the well. In some embodiments, instead of coating the well with the antigen, the binding agent or antibody can be coated to the well and a second antibody

conjugated to a detectable compound can be added following the addition of the antigen to the coated well. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to increase the signal detected as well as other variations of ELISAs known in the art.

[0105] In another example, the specific binding of an antibody to human VEGF and/or human DLL4 may be determined using FACS. A FACS screening assay may comprise generating a cDNA construct that expresses an antigen as a fusion protein, transfecting the construct into cells, expressing the antigen on the surface of the cells, mixing the binding agent or antibody with the transfected cells, and incubating for a period of time. The cells bound by the binding agent or antibody may be identified by using a secondary antibody conjugated to a detectable compound (e.g., PE-conjugated anti-Fc antibody) and a flow cytometer. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to optimize the signal detected as well as other variations of FACS that may enhance screening (e.g., screening for blocking antibodies).

[0106] The binding affinity of an antibody or other binding-agent to an antigen (e.g., VEGF or DLL4) and the off-rate of an antibody-antigen interaction can be determined by competitive binding assays. One example of a competitive binding assay is a radioimmunoassay comprising the incubation of labeled antigen (e.g., ^{3}H or ^{125}I), or fragment or variant thereof, with the antibody of interest in the presence of increasing amounts of unlabeled antigen followed by the detection of the antibody bound to the labeled antigen. The affinity of the antibody for the antigen and the binding off-rates can be determined from the data by Scatchard plot analysis. In some embodiments, Biacore kinetic analysis is used to determine the binding on and off rates of antibodies or agents that bind an antigen (e.g., VEGF or DLL4). Biacore kinetic analysis comprises analyzing the binding and dissociation of antibodies from chips with immobilized antigen (e.g., VEGF or DLL4) on their surface.

[0107] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human VEGF, wherein the VEGF-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 219R45 (see Table 1). In some embodiments, the VEGF-binding agent comprises one or more of the CDRs of 219R45, two or more of the CDRs of 219R45, three or more of the CDRs of 219R45, four or more of the CDRs of 219R45, five or more of the CDRs of 219R45, or all six of the CDRs of 219R45. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds human VEGF and mouse VEGF.

Table 1

	219R45
HC CDR1	NYWMH (SEQ ID NO:17)
HC CDR2	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)

HC CDR3	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)
LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

[0108] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human VEGF, wherein the VEGF-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). In some embodiments, the VEGF-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0109] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human VEGF, wherein the VEGF-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0110] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds VEGF, wherein the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent

comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:11. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:49, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF-binding antibody or other agent comprises a heavy chain comprising SEQ IDNO:7, and a light chain comprising SEQ ID NO:8.

[0111] In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 0.01nM or less. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the VEGF-binding agent is substituted with a different amino acid so that the affinity of the VEGF-binding agent for VEGF is altered. In some embodiments, the affinity of the VEGF-binding agent is increased. In some embodiments, the affinity of the VEGF-binding agent is decreased. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds human VEGF and mouse VEGF.

[0112] In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises the heavy chain variable region and light chain variable region of the 219R45 antibody. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 219R45 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, a VEGF-binding agent is the 219R45 antibody.

[0113] In certain embodiments, a VEGF-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 219R45.

[0114] In certain embodiments, a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as an antibody of the invention. In another embodiment, a VEGF-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as antibody 219R45. In another

embodiment, the VEGF-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by antibody 219R45.

[0115] In some embodiments, the VEGF-binding agent inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor. In certain embodiments, the VEGF-binding agent inhibits binding of human VEGF to VEGFR-1 or VEGFR-2. In some embodiments, the VEGF-binding agent specifically binds VEGF and modulates angiogenesis. In some embodiments, the VEGF-binding agent specifically binds VEGF and inhibits angiogenesis. In some embodiments, the VEGF-binding agent specifically binds VEGF and inhibits tumor growth.

[0116] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 21R79 (see Table 2). In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises one or more of the CDRs of 21R79, two or more of the CDRs of 21R79, three or more of the CDRs of 21R79, four or more of the CDRs of 21R79, five or more of the CDRs of 21R79, or all six of the CDRs of 21R79. In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 21R75 (see Table 2). In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises one or more of the CDRs of 21R75, two or more of the CDRs of 21R75, three or more of the CDRs of 21R75, four or more of the CDRs of 21R75, five or more of the CDRs of 21R75, or all six of the CDRs of 21R75. In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 21R83 (see Table 2). In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises one or more of the CDRs of 21R83, two or more of the CDRs of 21R83, three or more of the CDRs of 21R83, four or more of the CDRs of 21R83, five or more of the CDRs of 21R83, or all six of the CDRs of 21R83. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds human DLL4 and mouse DLL4.

Table 2

	21R79	21R75	21R83
HC CDR1	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)
HC CDR2	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)
HC CDR3	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)

LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

[0117] In certain embodiments, the heavy chain CDR1 of the DLL4-binding antibody is a minimal HC CDR1 comprising AYYIH (SEQ ID NO:79).

[0118] In some embodiments, the binding agent is an antibody that binds human DLL4 and comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0119] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the DLL4-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0120] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or

4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0121] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:10. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:48, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the DLL4-binding antibody or other agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:6, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody.

[0122] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the DLL4-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0123] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid

substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0124] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:58. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:58, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:58, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:56, and a light chain comprising SEQ ID NO:8.

[0125] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the DLL4-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0126] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0127] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:64. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:64, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:64, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:62, and a light chain comprising SEQ ID NO:8.In some embodiments, the agent is a bispecific antibody.

[0128] In some embodiments, the DLL4-binding agent is an antibody that comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:5, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody.

[0129] In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of 25nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of 10nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of about 0.1nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of about 0.01nM or less. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the DLL4-binding agent is substituted with a different amino acid so that the affinity of the DLL4-binding agent for DLL4 is altered. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding agent is increased. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding agent is decreased.

[0130] In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain variable region and the light chain variable region of the 21R79 antibody. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 21R79 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, the DLL4-binding agent is the 21R79 antibody.

[0131] In certain embodiments, a DLL4-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 21R79.

[0132] In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain variable region and the light chain variable region of the 21R75 antibody. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 21R75 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, the DLL4-binding agent is the 21R75 antibody.

[0133] In certain embodiments, a DLL4-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 21R75.

[0134] In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain variable region and the light chain variable region of the 21R83 antibody. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 21R83 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, the DLL4-binding agent is the 21R83 antibody.

[0135] In certain embodiments, a DLL4-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 21R83.

[0136] In some embodiments, a DLL4-binding agent binds an N-terminal fragment of human DLL4 (amino acids 1-191 of SEQ ID NO:24). In some embodiments, the DLL4-binding agent binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds an epitope comprising amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25 and amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

[0137] In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as an antibody of the invention. In another embodiment, a DLL4-

binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R79. In another embodiment, the DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R79. In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R75. In another embodiment, the DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R75. In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R83. In another embodiment, the DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R83.

[0138] In some embodiments, the DLL4-binding agent inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor. In certain embodiments, the Notch receptor is Notch1, Notch2, Notch3, or Notch4. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits DLL4 activity. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits Notch signaling. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and modulates angiogenesis. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits tumor growth. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits tumorigenicity. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and reduces the number or frequency of CSCs in a tumor.

[0139] In certain embodiments, the invention provides a VEGF/DLL4-binding agent that is a bispecific antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that binds a tumor-associated target. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR

(SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0140] In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11. In some embodiments, the bispecific antibody further comprises a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:11, and a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0141] In certain embodiments, the invention provides a VEGF/DLL4-binding agent that is a bispecific antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4 and a second antigen-binding site that binds a tumor-associated target. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy

chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0142] In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64. In some embodiments, the bispecific antibody further comprises a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0143] In certain embodiments, the invention provides a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., a bispecific antibody) that specifically binds human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising

$YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, a bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0144] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21R79.

[0145] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain

CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21M18.

[0146] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site which comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21R75.

[0147] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21R83.

[0148] In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent (e.g., a bispecific antibody) comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:11; a second heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and a first and a second light chain variable region having at least about 85%,

at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain

variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

[0149] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21M18. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R79 and two identical light chain variable regions. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21M18 and two identical light chain variable regions. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R75 and two identical light chain variable regions. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R83 and two identical light chain variable regions.

[0150] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers. In some embodiments, the first and second CH3 domains are modified using a knobs-into-holes technique. In some embodiments, the first and second CH3 domains comprise changes in amino acids that result in altered electrostatic interactions. In some embodiments, the first and second CH3 domains comprise changes in amino acids that result in altered hydrophobic/hydrophilic interactions.

[0151] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises heavy chain constant regions selected from the group consisting of: (a) a first human IgG1 constant region, wherein the amino acids at positions 253 and 292 are substituted with glutamate or aspartate, and a second human IgG1 constant region, wherein the amino acids at positions 240 and 282 are substituted

with lysine; (b) a first human IgG2 constant region, wherein the amino acids at positions 249 and 288 are substituted with glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region wherein the amino acids at positions 236 and 278 are substituted with lysine; (c) a first human IgG3 constant region, wherein the amino acids at positions 300 and 339 are substituted with glutamate or aspartate, and a second human IgG3 constant region wherein the amino acids at positions 287 and 329 are substituted with lysine; and (d) a first human IgG4 constant region, wherein the amino acids at positions 250 and 289 are substituted with glutamate or aspartate, and a second IgG4 constant region wherein the amino acids at positions 237 and 279 are substituted with lysine.

[0152] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG1 constant region with amino acid substitutions at positions 253 and 292, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG1 constant region with amino acid substitutions at positions 240 and 282, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG3 constant region with amino acid substitutions at positions 300 and 339, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 287 and 329, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG4 constant region with amino acid substitutions at positions 250 and 289, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG4 constant region with amino acid substitutions at positions 237 and 279, wherein the amino acids are lysine.

[0153] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are asparate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine.

[0154] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:5. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:56. In some

embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:62. In some embodiments, the bispecific antibody further comprises a light chain of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:5, and two light chains of SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:6, and two light chains of SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:56, and two light chains of SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:62, and two light chains of SEQ ID NO:8.

[0155] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which binds VEGF with a K_D of about 50nM or less, about 25nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which binds DLL4 with a K_D of about 50nM or less, about 25nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which binds VEGF with a K_D of about 50nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, the bispecific antibody binds VEGF with a K_D of about 25nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 25nM or less. In some embodiments, the bispecific antibody binds VEGF with a K_D of about 10nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, the bispecific antibody binds VEGF with a K_D of about 1nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 1nM or less.

[0156] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises one antigen-binding site with a binding affinity that is weaker than the binding affinity of the second antigen-binding site. For example, in some embodiments, the bispecific antibody may bind VEGF with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nM and may bind DLL4 with a K_D ranging from about 1nM to 10nM. Or the bispecific antibody may bind VEGF with a K_D ranging from about 1nM to 10nM and may bind DLL4 with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nM. In some embodiments, the bispecific antibody may bind DLL4 with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nM and may bind VEGF with a K_D ranging from about 1nM to 10nM. Or the bispecific antibody may bind DLL4 with a K_D ranging from about 1nM to 10nM and may bind VEGF with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nMIn some embodiments, the difference in affinity between the two antigen-binding sites may be about 2-fold or more, about 3-fold or more, about 5-fold or more, about 8-fold or more, about 10-fold or more, about 15-fold or more, about 30-fold or more, about 50-fold or more, or about 100-fold or more. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the antigen-binding site for VEGF is substituted with a different amino acid so that the affinity of the VEGF-binding site is altered. In some embodiments, the affinity of the

VEGF-binding site is increased. In some embodiments, the affinity of the VEGF-binding site is decreased. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the antigen-binding site for DLL4 is substituted with a different amino acid so that the affinity of the DLL4-binding site is altered. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding site is increased. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding site is decreased. In some embodiments, the affinities of both the VEGF and DLL4 antigen-binding sites are altered.

[0157] The invention provides polypeptides, including but not limited to antibodies, that specifically bind VEGF and/or DLL4. In some embodiments, a polypeptide binds human VEGF. In some embodiments, a polypeptide binds human DLL4. In some embodiments, a polypeptide binds human VEGF and mouse VEGF. In some embodiments, a polypeptide binds human DLL4 and mouse DLL4.

[0158] In some embodiments, a VEGF-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:47, and SEQ ID NO:49.

[0159] In some embodiments, a DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ NO ID:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

[0160] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

[0161] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, and SEQ ID NO:49. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:12.

[0162] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, and SEQ ID NO:49. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2,

SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:12.

[0163] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) competes for specific binding to VEGF with an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 219R45 for specific binding to human VEGF. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody competes for specific binding to VEGF in an *in vitro* competitive binding assay. In some embodiments, the VEGF is human VEGF. In some embodiments, the VEGF is mouse VEGF.

[0164] In certain embodiments, a VEGF-DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as an antibody of the invention. In another embodiment, a VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as antibody 219R45. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by antibody 219R45.

[0165] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF with the antibody 219R45 (e.g., in a competitive binding assay).

[0166] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) competes for specific binding to DLL4 with an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 21R79 for specific binding to human DLL4. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 21R75 for specific binding to human DLL4. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 21R83 for specific binding to human DLL4. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody competes for specific binding to DLL4 in an *in vitro* competitive binding assay. In some embodiments, the DLL4 is human DLL4. In some embodiments, the DLL4 is mouse DLL4.

[0167] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as an antibody of the invention. In another embodiment, a VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R79. In certain

embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R83. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R79. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R75. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R83.

[0168] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21R79 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21R75 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21R83 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21M18 (e.g., in a competitive binding assay).

[0169] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M18 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M79 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M75 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M83 (e.g., in a competitive binding assay).

[0170] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein binds VEGF and modulates VEGF activity. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and inhibits VEGF activity. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and modulates angiogenesis. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and inhibits angiogenesis. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and inhibits tumor growth.

[0171] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein binds human DLL4 and modulates DLL4 activity. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits DLL4 activity. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits Notch activity. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits Notch signaling. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a

DLL4 antagonist and modulates angiogenesis. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and promotes aberrant angiogenesis. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits tumor growth.

[0172] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein is a bispecific antibody that binds human VEGF and modulates VEGF activity. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein is a bispecific antibody that binds human DLL4 and modulates DLL4 activity. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein is a bispecific antibody that binds human VEGF and human DLL4 and modulates both VEGF and DLL4 activity. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits both VEGF activity and DLL4 activity. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits VEGF activity and Notch activity. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits VEGF activity and Notch signaling. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and modulates angiogenesis. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and promotes aberrant angiogenesis. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits angiogenesis. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits tumor growth.

[0173] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody or a bispecific antibody) is an antagonist of VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of VEGF and inhibits VEGF activity. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits VEGF activity by at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or about 100%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is antibody 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0174] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) is an antagonist of DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of DLL4 and inhibits DLL4 activity. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits DLL4 activity by at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about

90%, or about 100%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is antibody 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is antibody 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0175] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) is an antagonist of Notch signaling. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits Notch signaling by at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or about 100%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is antibody 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is antibody 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0176] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) inhibits binding of VEGF to at least one receptor. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of VEGF to VEGFR-1 or VEGFR-2. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor by at least about 10%, at least about 25%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or at least about 95%. In certain embodiments, a

VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is antibody 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0177] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) inhibits binding of DLL4 protein to at least one Notch receptor. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of DLL4 to Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor by at least about 10%, at least about 25%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or at least about 95%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is antibody 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is antibody 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0178] *In vivo* and *in vitro* assays for determining whether a VEGF/DLL4-binding agent (or candidate VEGF/DLL4-binding agent) inhibits VEGF or affects angiogenesis are known in the art. *In vitro* assays of angiogenesis include but are not limited to, HUVEC proliferation assays, endothelial cell tube

formation assays, sprouting (or sprout formation) assays, HUVEC cell migration assays, and invasion assays. In some embodiments, cells in the presence of VEGF and the presence of a VEGF/DLL4-binding agent are compared to cells in the presence of VEGF without the VEGF/DLL4-binding agent present, and evaluated for effects on angiogenesis (or biological effects associated with angiogenesis). *In vivo* assays of angiogenesis include, but are not limited to, matrigel plug assays, corneal micropocket assays, and chicken chorioallantoic membrane (CAM) assays.

[0179] *In vivo* and *in vitro* assays for determining whether a VEGF/DLL4-binding agent (or candidate VEGF/DLL4-binding agent) inhibits Notch activation or signaling are known in the art. For example, cell-based, luciferase reporter assays utilizing a TCF/Luc reporter vector containing multiple copies of the TCF-binding domain upstream of a firefly luciferase reporter gene may be used to measure Notch signaling levels *in vitro* (Gazit et al., 1999, *Oncogene,* 18; 5959-66; TOPflash, Millipore, Billerica MA). In some embodiments, a cell-based, luciferase reporter assay utilizing a CBF/Luc reporter vector containing multiple copies of the CBF-binding domain upstream of a firefly luciferase report genes may be used. The level of Notch signaling in the presence of one or more Notch ligands (e.g., DLL4 expressed on the surface of transfected cells or soluble DLL4-Fc fusion protein) and in the presence of a VEGF/DLL4-binding agent is compared to the level of Notch signaling without the VEGF/DLL4-binding agent present.

[0180] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents have one or more of the following effects: inhibit proliferation of tumor cells, inhibit tumor growth, reduce the tumorigenicity of a tumor, reduce the frequency of cancer stem cells in a tumor, trigger cell death of tumor cells, prevent metastasis of tumor cells, decrease survival of tumor cells, modulate angiogenesis, inhibit angiogenesis, inhibit productive angiogenesis, or promote aberrant angiogenesis.

[0181] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting tumor growth. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting tumor growth *in vivo* (e.g., in a xenograft mouse model, and/or in a human having cancer). In certain embodiments, tumor growth is inhibited at least about two-fold, about three-fold, about five-fold, about ten-fold, about 50-fold, about 100-fold, or about 1000-fold as compared to an untreated tumor.

[0182] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of reducing the tumorigenicity of a tumor. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent or antibody is capable of reducing the tumorigenicity of a tumor comprising cancer stem cells in an animal model, such as a mouse xenograft model. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent or antibody is capable of reducing the tumorigenicity of a tumor by decreasing the number or frequency of cancer stem cells in the tumor. In certain embodiments, the number or frequency of cancer stem cells in a tumor is reduced by at least about two-fold, about three-fold, about five-fold, about ten-fold, about 50-fold, about 100-fold, or about 1000-fold. In certain embodiments, the reduction in the number or frequency of cancer stem cells is

determined by limiting dilution assay using an animal model. Additional examples and guidance regarding the use of limiting dilution assays to determine a reduction in the number or frequency of cancer stem cells in a tumor can be found, e.g., in International Publication Number WO 2008/042236; U.S. Patent Publication No. 2008/0064049; and U.S. Patent Publication No. 2008/0178305.

[0183] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of modulating angiogenesis. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of modulating angiogenesis *in vivo* (e.g., in a xenograft mouse model, and/or in a human having cancer). In certain embodiments, VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting angiogenesis. In certain embodiments, VEGF/DLL4-binding agents are capable of promoting aberrant angiogenesis. In certain embodiments, VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting angiogenesis and/or promoting aberrant angiogenesis, leading to unproductive vascularization.

[0184] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents described herein have a circulating half-life in mice, cynomolgus monkeys, or humans of at least about 2 hours, at least about 5 hours, at least about 10 hours, at least about 24 hours, at least about 3 days, at least about 1 week, or at least about 2 weeks. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an IgG (e.g., IgG1 or IgG2) antibody that has a circulating half-life in mice, cynomolgus monkeys, or humans of at least about 2 hours, at least about 5 hours, at least about 10 hours, at least about 24 hours, at least about 3 days, at least about 1 week, or at least about 2 weeks. Methods of increasing (or decreasing) the half-life of agents such as polypeptides and antibodies are known in the art. For example, known methods of increasing the circulating half-life of IgG antibodies include the introduction of mutations in the Fc region which increase the pH-dependent binding of the antibody to the neonatal Fc receptor (FcRn) at pH 6.0 (see, e.g., U.S. Patent Publication Nos. 2005/0276799, 2007/0148164, and 2007/0122403). Known methods of increasing the circulating half-life of antibody fragments lacking the Fc region include such techniques as PEGylation.

[0185] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are antibodies. Polyclonal antibodies can be prepared by any known method. In some embodiments, polyclonal antibodies are produced by immunizing an animal (e.g., a rabbit, rat, mouse, goat, donkey) with an antigen of interest (e.g., a purified peptide fragment, full-length recombinant protein, or fusion protein) by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The antigen can be optionally conjugated to a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) or serum albumin. The antigen (with or without a carrier protein) is diluted in sterile saline and usually combined with an adjuvant (e.g., Complete or Incomplete Freund's Adjuvant) to form a stable emulsion. After a sufficient period of time, polyclonal antibodies are recovered from the immunized animal, usually from blood or ascites. The polyclonal antibodies can be purified from serum or ascites according to standard methods in the art including, but not limited to, affinity chromatography, ion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and dialysis.

[0186] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods known to one of skill in the art (see e.g., Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497). In some embodiments, using the hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is immunized as described above to elicit from lymphocytes the production of antibodies that specifically bind the immunizing antigen. In some embodiments, lymphocytes can be immunized *in vitro*. In some embodiments, the immunizing antigen can be a human protein or a portion thereof. In some embodiments, the immunizing antigen can be a mouse protein or a portion thereof.

[0187] Following immunization, lymphocytes are isolated and fused with a suitable myeloma cell line using, for example, polyethylene glycol. The hybridoma cells are selected using specialized media as known in the art and unfused lymphocytes and myeloma cells do not survive the selection process. Hybridomas that produce monoclonal antibodies directed specifically against a chosen antigen may be identified by a variety of methods including, but not limited to, immunoprecipitation, immunoblotting, and *in vitro* binding assays (e.g., flow cytometry, FACS, ELISA, and radioimmunoassay). The hybridomas can be propagated either in *in vitro* culture using standard methods (J.W. Goding, 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3^{rd} *Edition*, Academic Press, San Diego, CA) or *in vivo* as ascites tumors in an animal. The monoclonal antibodies can be purified from the culture medium or ascites fluid according to standard methods in the art including, but not limited to, affinity chromatography, ion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and dialysis.

[0188] In certain embodiments, monoclonal antibodies can be made using recombinant DNA techniques as known to one skilled in the art. The polynucleotides encoding a monoclonal antibody are isolated from mature B-cells or hybridoma cells, such as by RT-PCR using oligonucleotide primers that specifically amplify the genes encoding the heavy and light chains of the antibody, and their sequence is determined using standard techniques. The isolated polynucleotides encoding the heavy and light chains are then cloned into suitable expression vectors which produce the monoclonal antibodies when transfected into host cells such as E. coli, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin proteins.

[0189] In certain other embodiments, recombinant monoclonal antibodies, or fragments thereof, can be isolated from phage display libraries expressing variable domains or CDRs of a desired species (see e.g., McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; and Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581-597).

[0190] The polynucleotide(s) encoding a monoclonal antibody can be modified, for example, by using recombinant DNA technology to generate alternative antibodies. In some embodiments, the constant domains of the light and heavy chains of, for example, a mouse monoclonal antibody can be substituted for those regions of, for example, a human antibody to generate a chimeric antibody, or for a non-

immunoglobulin polypeptide to generate a fusion antibody. In some embodiments, the constant regions are truncated or removed to generate the desired antibody fragment of a monoclonal antibody. Site-directed or high-density mutagenesis of the variable region can be used to optimize specificity, affinity, etc. of a monoclonal antibody.

[0191] In some embodiments, a monoclonal antibody against VEGF and/or DLL4 is a humanized antibody. Typically, humanized antibodies are human immunoglobulins in which residues from the CDRs are replaced by residues from a CDR of a non-human species (e.g., mouse, rat, rabbit, hamster, etc.) that have the desired specificity, affinity, and/or binding capability using methods known to one skilled in the art. In some embodiments, the Fv framework region residues of a human immunoglobulin are replaced with the corresponding residues in an antibody from a non-human species that has the desired specificity, affinity, and/or binding capability. In some embodiments, a humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residues either in the Fv framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or capability. In general, a humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two or three, variable domain regions containing all, or substantially all, of the CDRs that correspond to the non-human immunoglobulin whereas all, or substantially all, of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. In some embodiments, a humanized antibody can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. In certain embodiments, such humanized antibodies are used therapeutically because they may reduce antigenicity and HAMA (human anti-mouse antibody) responses when administered to a human subject. One skilled in the art would be able to obtain a functional humanized antibody with reduced immunogenicity following known techniques (see e.g., U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; and 5,693,762).

[0192] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a human antibody. Human antibodies can be directly prepared using various techniques known in the art. In some embodiments, human antibodies may be generated from immortalized human B lymphocytes immunized *in vitro* or from lymphocytes isolated from an immunized individual. In either case, cells that produce an antibody directed against a target antigen can be generated and isolated (see, e.g., Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer et al., 1991, *J. Immunol.,* 147:86-95; and U.S. Patent Nos. 5,750,373; 5,567,610; and 5,229,275). In some embodiments, the human antibody can be selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS,* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.,* 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581). Alternatively, phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable domain gene repertoires from unimmunized donors. Techniques for the

generation and use of antibody phage libraries are also described in U.S. Patent Nos. 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; and 7,264,963; and Rothe et al., 2008, *J. Mol. Bio.,* 376:1182-1200. Once antibodies are identified, affinity maturation strategies known in the art, including but not limited to, chain shuffling (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783) and site-directed mutagenesis, may be employed to generate high affinity human antibodies.

[0193] In some embodiments, human antibodies can be made in transgenic mice that contain human immunoglobulin loci. Upon immunization these mice are capable of producing the full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. This approach is described in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016.

[0194] This invention also encompasses bispecific antibodies. Bispecific antibodies are capable of specifically recognizing and binding at least two different antigens or epitopes. The different epitopes can either be within the same molecule (e.g., two epitopes on a single protein) or on different molecules (e.g., one epitope on a protein and one epitope on a second protein). In some embodiments, a bispecific antibody has enhanced potency as compared to an individual antibody or to a combination of more than one antibody. In some embodiments, a bispecific antibody has reduced toxicity as compared to an individual antibody or to a combination of more than one antibody. It is known to those of skill in the art that any binding agent (e.g., antibody) may have unique pharmacokinetics (PK) (e.g., circulating half-life). In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to synchronize the PK of two active binding agents wherein the two individual binding agents have different PK profiles. In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to concentrate the actions of two binding agents (e.g., antibodies) in a common area (e.g., a tumor and/or tumor environment). In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to concentrate the actions of two binding agents (e.g., antibodies) to a common target (e.g., a tumor or a tumor cell). In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to target the actions of two binding agents (e.g., antibodies) to more than one biological pathway or function.

[0195] In certain embodiments, the bispecific antibody specifically binds VEGF and a second target. In certain embodiments, the bispecific antibody specifically binds DLL4 and a second target. In certain embodiments, the bispecific antibody specifically binds VEGF and DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody is a monoclonal human or a humanized antibody. In some embodiments, the bispecific antibody inhibits angiogenesis and reduces cancer stem cell number or frequency. In some embodiments, the bispecific antibody inhibits blood vessel growth and inhibits blood vessel maturation. In some embodiments, the bispecific antibody prevents endothelial hyperproliferation. In some embodiments, the bispecific antibody has decreased toxicity and/or side effects. In some embodiments,

the bispecific antibody has decreased toxicity and/or side effects as compared to a mixture of the two individual antibodies or the antibodies as single agents. In some embodiments, the bispecific antibody has an increased therapeutic index. In some embodiments, the bispecific antibody has an increased therapeutic index as compared to a mixture of the two individual antibodies or the antibodies as single agents.

[0196] In some embodiments, the bispecific antibody can specifically recognize and bind a first antigen target, (e.g., DLL4) as well as a second antigen target, such as an effector molecule on a leukocyte (e.g., CD2, CD3, CD28, or B7) or a Fc receptor (e.g., CD64, CD32, or CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the first antigen target. In some embodiments, the bispecific antibodies can be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular target antigen. These antibodies possess an antigen-binding site (e.g., to human DLL4) and a second site which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA.

[0197] Techniques for making bispecific antibodies are known by those skilled in the art, see for example, Millstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.,* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.,* 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.,* 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.,* 152:5368; U.S. Patent No. 5,731,168; International Publication No. WO 2009/089004; and U.S. Patent Publication No. 2011/0123532. In some embodiments, the bispecific antibodies comprise heavy chain constant regions with modifications in the amino acids which are part of the interface between the two heavy chains. In some embodiments, the bispecific antibodies can be generated using a "knobs-into-holes" strategy (see. e.g., U.S. Patent No. 5,731,168; Ridgway et. al., 1996, *Prot. Engin.*, 9:617-621). At times the "knobs" and "holes" terminology is replaced with the terms "protuberances" and "cavities". In some embodiments, the bispecific antibodies may comprise variant hinge regions incapable of forming disulfide linkages between the heavy chains (see, e.g., WO 2006/028936). In some embodiments, the modifications may comprise changes in amino acids that result in altered electrostatic interactions. In some embodiments, the modifications may comprise changes in amino acids that result in altered hydrophobic/hydrophilic interactions.

[0198] Bispecific antibodies can be intact antibodies or antibody fragments comprising antigen-binding sites. Antibodies with more than two valencies are also contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared (Tutt et al., 1991, *J. Immunol.*, 147:60). Thus, in certain embodiments the antibodies to VEGF and/or DLL4 are multispecific.

[0199] In certain embodiments, the antibodies (or other polypeptides) described herein may be monospecific. In certain embodiments, each of the one or more antigen-binding sites that an antibody contains is capable of binding (or binds) a homologous epitope on different proteins.

[0200] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody fragment. Antibody fragments may have different functions or capabilities than intact antibodies; for example, antibody fragments can have increased tumor penetration. Various techniques are known for the production of antibody fragments including, but not limited to, proteolytic digestion of intact antibodies. In some embodiments, antibody fragments include a F(ab')2 fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule. In some embodiments, antibody fragments include a Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an F(ab')2 fragment. In other embodiments, antibody fragments include a Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent. In certain embodiments, antibody fragments are produced recombinantly. In some embodiments, antibody fragments include Fv or single chain Fv (scFv) fragments. Fab, Fv, and scFv antibody fragments can be expressed in and secreted from E. coli or other host cells, allowing for the production of large amounts of these fragments. In some embodiments, antibody fragments are isolated from antibody phage libraries as discussed herein. For example, methods can be used for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., 1989, *Science*, 246:1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for VEGF and/or DLL4 or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. In some embodiments, antibody fragments are linear antibody fragments. In certain embodiments, antibody fragments are monospecific or bispecific. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a scFv. Various techniques can be used for the production of single-chain antibodies specific to VEGF or DLL4 (see, e.g., U.S. Patent No. 4,946,778).

[0201] It can further be desirable, especially in the case of antibody fragments, to modify an antibody in order to alter (e.g., increase or decrease) its serum half-life. This can be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle (e.g., by DNA or peptide synthesis).

[0202] Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune cells to unwanted cells (see, e.g., U.S. Patent No. 4,676,980). It is also contemplated that the heteroconjugate antibodies can be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

[0203] For the purposes of the present invention, it should be appreciated that modified antibodies can comprise any type of variable region that provides for the association of the antibody with the target (i.e., human VEGF or human DLL4). In this regard, the variable region may comprise or be derived from any type of mammal that can be induced to mount a humoral response and generate immunoglobulins against

the desired antigen. As such, the variable region of the modified antibodies can be, for example, of human, murine, non-human primate (e.g. cynomolgus monkeys, macaques, etc.) or rabbit origin. In some embodiments, both the variable and constant regions of the modified immunoglobulins are human. In other embodiments, the variable regions of compatible antibodies (usually derived from a non-human source) can be engineered or specifically tailored to improve the binding properties or reduce the immunogenicity of the molecule. In this respect, variable regions useful in the present invention can be humanized or otherwise altered through the inclusion of imported amino acid sequences.

[0204] In certain embodiments, the variable domains in both the heavy and light chains are altered by at least partial replacement of one or more CDRs and, if necessary, by partial framework region replacement and sequence modification and/or alteration. Although the CDRs may be derived from an antibody of the same class or even subclass as the antibody from which the framework regions are derived, it is envisaged that the CDRs may be derived from an antibody of different class and often from an antibody from a different species. It may not be necessary to replace all of the CDRs with all of the CDRs from the donor variable region to transfer the antigen binding capacity of one variable domain to another. Rather, it may only be necessary to transfer those residues that are required to maintain the activity of the antigen-binding site.

[0205] Alterations to the variable region notwithstanding, those skilled in the art will appreciate that the modified antibodies of this invention will comprise antibodies (e.g., full-length antibodies or immunoreactive fragments thereof) in which at least a fraction of one or more of the constant region domains has been deleted or otherwise altered so as to provide desired biochemical characteristics such as increased tumor localization or increased serum half-life when compared with an antibody of approximately the same immunogenicity comprising a native or unaltered constant region. In some embodiments, the constant region of the modified antibodies will comprise a human constant region. Modifications to the constant region compatible with this invention comprise additions, deletions or substitutions of one or more amino acids in one or more domains. The modified antibodies disclosed herein may comprise alterations or modifications to one or more of the three heavy chain constant domains (CH1, CH2 or CH3) and/or to the light chain constant domain (CL). In some embodiments, one or more domains are partially or entirely deleted from the constant regions of the modified antibodies. In some embodiments, the modified antibodies will comprise domain deleted constructs or variants wherein the entire CH2 domain has been removed (ΔCH2 constructs). In some embodiments, the omitted constant region domain is replaced by a short amino acid spacer (e.g., 10 amino acid residues) that provides some of the molecular flexibility typically imparted by the absent constant region.

[0206] In some embodiments, the modified antibodies are engineered to fuse the CH3 domain directly to the hinge region of the antibody. In other embodiments, a peptide spacer is inserted between the hinge region and the modified CH2 and/or CH3 domains. For example, constructs may be expressed wherein

the CH2 domain has been deleted and the remaining CH3 domain (modified or unmodified) is joined to the hinge region with a 5-20 amino acid spacer. Such a spacer may be added to ensure that the regulatory elements of the constant domain remain free and accessible or that the hinge region remains flexible. However, it should be noted that amino acid spacers may, in some cases, prove to be immunogenic and elicit an unwanted immune response against the construct. Accordingly, in certain embodiments, any spacer added to the construct will be relatively non-immunogenic so as to maintain the desired biological qualities of the modified antibodies.

[0207] In some embodiments, the modified antibodies may have only a partial deletion of a constant domain or substitution of a few or even a single amino acid. For example, the mutation of a single amino acid in selected areas of the CH2 domain may be enough to substantially reduce Fc binding and thereby increase cancer cell localization and/or tumor penetration. Similarly, it may be desirable to simply delete the part of one or more constant region domains that control a specific effector function (e.g. complement C1q binding) to be modulated. Such partial deletions of the constant regions may improve selected characteristics of the antibody (serum half-life) while leaving other desirable functions associated with the subject constant region domain intact. Moreover, as alluded to above, the constant regions of the disclosed antibodies may be modified through the mutation or substitution of one or more amino acids that enhances the profile of the resulting construct. In this respect it may be possible to disrupt the activity provided by a conserved binding site (e.g., Fc binding) while substantially maintaining the configuration and immunogenic profile of the modified antibody. In certain embodiments, the modified antibodies comprise the addition of one or more amino acids to the constant region to enhance desirable characteristics such as decreasing or increasing effector function or provide for more cytotoxin or carbohydrate attachment sites.

[0208] It is known in the art that the constant region mediates several effector functions. For example, binding of the C1 component of complement to the Fc region of IgG or IgM antibodies (bound to antigen) activates the complement system. Activation of complement is important in the opsonization and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and can also be involved in autoimmune hypersensitivity. In addition, the Fc region of an antibody can bind a cell expressing a Fc receptor (FcR). There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including IgG (gamma receptors), IgE (epsilon receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell cytotoxicity or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer, and control of immunoglobulin production.

[0209] In certain embodiments, the modified antibodies provide for altered effector functions that, in turn, affect the biological profile of the administered antibody. For example, in some embodiments, the deletion or inactivation (through point mutations or other means) of a constant region domain may reduce Fc receptor binding of the circulating modified antibody thereby increasing cancer cell localization and/or tumor penetration. In other embodiments, the constant region modifications increase the serum half-life of the antibody. In other embodiments, the constant region modifications reduce the serum half-life of the antibody. In some embodiments, the constant region is modified to eliminate disulfide linkages or oligosaccharide moieties. Modifications to the constant region in accordance with this invention may easily be made using well known biochemical or molecular engineering techniques known to those of skill in the art.

[0210] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that is an antibody does not have one or more effector functions. For instance, in some embodiments, the antibody has no ADCC activity, and/or no complement-dependent cytotoxicity (CDC) activity. In certain embodiments, the antibody does not bind an Fc receptor, and/or complement factors. In certain embodiments, the antibody has no effector function.

[0211] The present invention further embraces variants and equivalents which are substantially homologous to the chimeric, humanized, and human antibodies, or antibody fragments thereof, set forth herein. These can contain, for example, conservative substitution mutations, i.e. the substitution of one or more amino acids by similar amino acids. For example, conservative substitution refers to the substitution of an amino acid with another amino acid within the same general class such as, for example, one acidic amino acid with another acidic amino acid, one basic amino acid with another basic amino acid or one neutral amino acid by another neutral amino acid. What is intended by a conservative amino acid substitution is well known in the art and described herein.

[0212] Thus, the present invention provides methods for producing an antibody that binds VEGF and/or DLL4, including bispecific antibodies that specifically bind both VEGF and DLL4. In some embodiments, the method for producing an antibody that binds VEGF and/or DLL4 comprises using hybridoma techniques. In some embodiments, the method of generating an antibody that binds VEGF or DLL4 or a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4 comprises screening a human phage library. The present invention further provides methods of identifying an antibody that binds VEGF and/or DLL4. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for binding to VEGF or a portion thereof. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for binding to DLL4 or a portion thereof. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for binding to both VEGF and DLL4 or a portion thereof. In some embodiments, the antibody is identified by screening using ELISA for binding to VEGF. In some embodiments, the antibody is identified by screening using ELISA for binding to DLL4. In some embodiments, the antibody is identified by screening using ELISA

for binding to VEGF and DLL4. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for blocking of binding of human VEGF to a human VEGF receptor. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for blocking of binding of human DLL4 to a human Notch receptor. In some embodiments, the antibody is identified by screening for inhibition or blocking of Notch signaling. In some embodiments, the antibody is identified by screening for inhibition or blocking of VEGF activity (e.g., induction of HUVEC proliferation). In some embodiments, the antibody is identified by screening for modulation of angiogenesis.

[0213] In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising amino acids 27-232 of human VEGF. In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF. In some embodiments, the method further comprises isolating antibodies or antibody-producing cells from the mammal. In some embodiments, a method of generating a monoclonal antibody which binds VEGF comprises: immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF, and isolating antibody-producing cells from the immunized mammal. In some embodiments, the method further comprises fusing the antibody-producing cells with cells of a myeloma cell line to form hybridoma cells. In some embodiments, the method further comprises selecting a hybridoma cell expressing an antibody that binds VEGF. In certain embodiments, the mammal is a mouse. In some embodiments, the antibody is selected using a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF.

[0214] In some embodiments, a method of generating an antibody to human DLL4 comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising amino acids 27-529 of human DLL4. In some embodiments, a method of generating an antibody to human DLL4 comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4. In some embodiments, a method of generating a monoclonal antibody which binds DLL4 comprises: immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4, and isolating antibody producing cells from the immunized mammal. In some embodiments, the method further comprises fusing the antibody-producing cells with cells of a myeloma cell line to form hybridoma cells. In some embodiments, the method further comprises selecting a hybridoma cell expressing an antibody that binds DLL4. In certain embodiments, the mammal is a mouse. In some embodiments, the antibody is selected using a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4.

[0215] In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF comprises screening an antibody-expressing library for antibodies that bind human VEGF. In some embodiments, a method of generating an antibody human DLL4 comprises screening an antibody-expressing library for antibodies

that bind human DLL4. In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF and/or human DLL4 comprises screening an antibody-expressing library for bispecific antibodies that bind human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the antibody-expressing library is a phage library. In some embodiments, the screening comprises panning. In some embodiments, the antibody-expressing library (e.g., a phage library) is screened using at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF. In some embodiments, antibodies identified in the first screening, are screened again using at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4 to identify a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4. In some embodiments, the antibody-expressing library (e.g., a phage library) is screened using at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4. In some embodiments, antibodies identified in the first screening, are screened again using at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF to identify a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4. In some embodiments, the antibody identified in the screening is a VEGF antagonist. In some embodiments, the antibody identified in the screening inhibits biological activities induced by VEGF. In some embodiments, the antibody identified in the screening is a DLL4 antagonist. In some embodiments, the antibody identified in the screening inhibits Notch signaling induced by DLL4. In some embodiments, the antibody identified in the screening binds both human VEGF and mouse VEGF. In some embodiments, the antibody identified in the screening binds both human DLL4 and mouse DLL4.

[0216] In certain embodiments, the antibodies described herein are isolated. In certain embodiments, the antibodies described herein are substantially pure.

[0217] In some embodiments of the present invention, the VEGF/DLL4-binding agents are polypeptides. The polypeptides can be recombinant polypeptides, natural polypeptides, or synthetic polypeptides comprising an antibody, or fragment thereof, that bind VEGF and/or DLL4. It will be recognized in the art that some amino acid sequences of the binding agents described herein can be varied without significant effect on the structure or function of the protein. Thus, the invention further includes variations of the polypeptides which show substantial activity or which include regions of an antibody, or fragment thereof, against human VEGF and/or DLL4. In some embodiments, amino acid sequence variations of VEGF/DLL4-binding polypeptides include deletions, insertions, inversions, repeats, and/or other types of substitutions.

[0218] In some embodiments, the polypeptides described herein are isolated. In some embodiments, the polypeptides described herein are substantially pure.

[0219] The polypeptides, analogs and variants thereof, can be further modified to contain additional chemical moieties not normally part of the polypeptide. The derivatized moieties can improve or otherwise modulate the solubility, the biological half-life, and/or absorption of the polypeptide. The moieties can also reduce or eliminate undesirable side effects of the polypeptides and variants. An

overview for chemical moieties can be found in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st *Edition*, 2005, University of the Sciences, Philadelphia, PA.

[0220] The polypeptides described herein can be produced by any suitable method known in the art. Such methods range from direct protein synthesis methods to constructing a DNA sequence encoding polypeptide sequences and expressing those sequences in a suitable host. In some embodiments, a DNA sequence is constructed using recombinant technology by isolating or synthesizing a DNA sequence encoding a wild-type protein of interest. Optionally, the sequence can be mutagenized by site-specific mutagenesis to provide functional analogs thereof. See, e.g., Zoeller et al., 1984, *PNAS,* 81:5662-5066 and U.S. Patent No. 4,588,585.

[0221] In some embodiments, a DNA sequence encoding a polypeptide of interest may be constructed by chemical synthesis using an oligonucleotide synthesizer. Oligonucleotides can be designed based on the amino acid sequence of the desired polypeptide and selecting those codons that are favored in the host cell in which the recombinant polypeptide of interest will be produced. Standard methods can be applied to synthesize a polynucleotide sequence encoding an isolated polypeptide of interest. For example, a complete amino acid sequence can be used to construct a back-translated gene. Further, a DNA oligomer containing a nucleotide sequence coding for the particular isolated polypeptide can be synthesized. For example, several small oligonucleotides coding for portions of the desired polypeptide can be synthesized and then ligated. The individual oligonucleotides typically contain 5' or 3' overhangs for complementary assembly.

[0222] Once assembled (by synthesis, site-directed mutagenesis, or another method), the polynucleotide sequences encoding a particular polypeptide of interest can be inserted into an expression vector and operatively linked to an expression control sequence appropriate for expression of the protein in a desired host. Proper assembly can be confirmed by nucleotide sequencing, restriction enzyme mapping, and/or expression of a biologically active polypeptide in a suitable host. As is well-known in the art, in order to obtain high expression levels of a transfected gene in a host, the gene must be operatively linked to transcriptional and translational expression control sequences that are functional in the chosen expression host.

[0223] In certain embodiments, recombinant expression vectors are used to amplify and express DNA encoding antibodies, or fragments thereof, against human VEGF and/or DLL4. For example, recombinant expression vectors can be replicable DNA constructs which have synthetic or cDNA-derived DNA fragments encoding a polypeptide chain of a VEGF/DLL4-binding agent, such as an anti-VEGF antibody or an anti-DLL4 antibody, or fragment thereof, operatively linked to suitable transcriptional and/or translational regulatory elements derived from mammalian, microbial, viral, or insect genes. A transcriptional unit generally comprises an assembly of (1) a genetic element or elements having a regulatory role in gene expression, for example, transcriptional promoters or enhancers, (2) a structural or

coding sequence which is transcribed into mRNA and translated into protein, and (3) appropriate transcription and translation initiation and termination sequences. Regulatory elements can include an operator sequence to control transcription. The ability to replicate in a host, usually conferred by an origin of replication, and a selection gene to facilitate recognition of transformants can additionally be incorporated. DNA regions are "operatively linked" when they are functionally related to each other. For example, DNA for a signal peptide (secretory leader) is operatively linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a precursor which participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operatively linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operatively linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. In some embodiments, structural elements intended for use in yeast expression systems include a leader sequence enabling extracellular secretion of translated protein by a host cell. In other embodiments, in situations where recombinant protein is expressed without a leader or transport sequence, it can include an N-terminal methionine residue. This residue can optionally be subsequently cleaved from the expressed recombinant protein to provide a final product.

[0224] The choice of an expression control sequence and an expression vector depends upon the choice of host. A wide variety of expression host/vector combinations can be employed. Useful expression vectors for eukaryotic hosts include, for example, vectors comprising expression control sequences from SV40, bovine papilloma virus, adenovirus, and cytomegalovirus. Useful expression vectors for bacterial hosts include known bacterial plasmids, such as plasmids from E. coli, including pCR1, pBR322, pMB9, and their derivatives, and wider host range plasmids, such as M13 and other filamentous single-stranded DNA phages.

[0225] The VEGF/DLL4-binding agents (e.g., polypeptides) of the present invention can be expressed from one or more vectors. For example, in some embodiments, one heavy chain polypeptide is expressed by one vector, a second heavy chain polypeptide is expressed by a second vector and a light chain polypeptide is expressed by a third vector. In some embodiments, a first heavy chain polypeptide and a light chain polypeptide is expressed by one vector and a second heavy chain polypeptide is expressed by a second vector. In some embodiments, two heavy chain polypeptides are expressed by one vector and a light chain polypeptide is expressed by a second vector. In some embodiments, three polypeptides are expressed from one vector. Thus, in some embodiments, a first heavy chain polypeptide, a second heavy chain polypeptide, and a light chain polypeptide are expressed by a single vector.

[0226] Suitable host cells for expression of a VEGF/DLL4-binding polypeptide or antibody (or a VEGF or DLL4 protein to use as an antigen) include prokaryotes, yeast cells, insect cells, or higher eukaryotic cells under the control of appropriate promoters. Prokaryotes include gram-negative or gram-positive organisms, for example E. coli or Bacillus. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described below. Cell-free translation systems may also be employed. Appropriate

cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described in Pouwels et al., 1985, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, NY. Additional information regarding methods of protein production, including antibody production, can be found, e.g., in U.S. Patent Publication No. 2008/0187954; U.S. Patent Nos. 6,413,746; 6,660,501; and International Patent Publication No. WO 04/009823.

[0227] Various mammalian or insect cell culture systems may be used to express recombinant polypeptides. Expression of recombinant proteins in mammalian cells may be desirable because these proteins are generally correctly folded, appropriately modified, and biologically functional. Examples of suitable mammalian host cell lines include, but are not limited to, COS-7 (monkey kidney-derived), L-929 (murine fibroblast-derived), C127 (murine mammary tumor-derived), 3T3 (murine fibroblast-derived), CHO (Chinese hamster ovary-derived), HeLa (human cervical cancer-derived), BHK (hamster kidney fibroblast-derived), HEK-293 (human embryonic kidney-derived) cell lines and variants of these cell lines. Mammalian expression vectors can comprise non-transcribed elements such as an origin of replication, a suitable promoter and enhancer linked to the gene to be expressed, and other 5' or 3' flanking non-transcribed sequences, and 5' or 3' non-translated sequences, such as necessary ribosome binding sites, a polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, and transcriptional termination sequences. Expression of recombinant proteins in baculovirus also offers a robust method for producing correctly folded and biologically functional proteins. Baculovirus systems for production of heterologous proteins in insect cells are well-known to those of skill in the art (see, e.g., Luckow and Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

[0228] Thus, the present invention provides cells comprising the VEGF/DLL4-binding agents described herein. In some embodiments, the cells produce the VEGF/DLL4-binding agents described herein. In certain embodiments, the cells produce an antibody. In some embodiments, the cells produce a VEGF-binding agent, such as an anti-VEGF antibody. In some embodiments, the cells produce a bispecific antibody that binds VEGF. In some embodiments, the cells produce a DLL4-binding agent, such as an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the cells produce a bispecific antibody that binds DLL4. In certain embodiments, the cells produce a bispecific VEGF/DLL4-binding agent, such as a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4. In certain embodiments, the cells produce antibody 219R45. In certain embodiments, the cells produce antibody 21R79. In certain embodiments, the cells produce antibody 21R75. In certain embodiments, the cells produce antibody 21R83. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 21R79. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 21R75. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 21R83. In certain embodiments, the

cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21R79. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21M18. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21R75. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21R83. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0229] The proteins produced by a transformed host can be purified according to any suitable method. Standard methods include chromatography (e.g., ion exchange, affinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for protein purification. Affinity tags such as hexa-histidine, maltose binding domain, influenza coat sequence, and glutathione-S-transferase can be attached to the protein to allow easy purification by passage over an appropriate affinity column. Affinity chromatography used for purifying immunoglobulins can include Protein A, Protein G, and Protein L chromatography. Isolated proteins can be physically characterized using such techniques as proteolysis, size exclusion chromatography (SEC), mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR), isoelectric focusing (IEF), high performance liquid chromatography (HPLC), and x-ray crystallography. The purity of isolated proteins can be determined using techniques known to those of skill in the art, including but not limited to, SDS-PAGE, SEC, capillary gel electrophoresis, IEF, and capillary isoelectric focusing (cIEF).

[0230] In some embodiments, supernatants from expression systems which secrete recombinant protein into culture media can be first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Following the concentration step, the concentrate can be applied to a suitable purification matrix. In some embodiments, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose, or other types commonly employed in protein purification. In some embodiments, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. In some embodiments, a hydroxyapatite media can be employed, including but not limited to, ceramic hydroxyapatite (CHT). In certain embodiments, one or more reverse-phase HPLC steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify a recombinant protein (e.g., a VEGF/DLL4-binding agent). Some or all of the

foregoing purification steps, in various combinations, can be employed to provide a homogeneous recombinant protein.

[0231] In some embodiments, heterodimeric proteins such as bispecific antibodies are purified according the any of the methods described herein. In some embodiments, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies are isolated and/or purified using at least one chromatography step. In some embodiments, the at least one chromatography step comprises affinity chromatography. In some embodiments, the at least one chromatography step further comprises anion exchange chromatography. In some embodiments, the isolated and/or purified antibody product comprises at least 90% heterodimeric antibody. In some embodiments, the isolated and/or purified antibody product comprises at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% heterodimeric antibody. In some embodiments, the isolated and/or purified antibody product comprises about 100% heterodimeric antibody.

[0232] In some embodiments, recombinant protein produced in bacterial culture can be isolated, for example, by initial extraction from cell pellets, followed by one or more concentration, salting-out, aqueous ion exchange, or size exclusion chromatography steps. HPLC can be employed for final purification steps. Microbial cells employed in expression of a recombinant protein can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

[0233] Methods known in the art for purifying antibodies and other proteins also include, for example, those described in U.S. Patent Publication Nos. 2008/0312425; 2008/0177048; and 2009/0187005.

[0234] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a polypeptide that is not an antibody. A variety of methods for identifying and producing non-antibody polypeptides that bind with high affinity to a protein target are known in the art. See, e.g., Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse et al., 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill et al., 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; and Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83. In certain embodiments, phage or mammalian cell display technology may be used to produce and/or identify a VEGF/DLL4-binding polypeptide that is not an antibody. In certain embodiments, the polypeptide comprises a protein scaffold of a type selected from the group consisting of protein A, protein G, a lipocalin, a fibronectin domain, an ankyrin consensus repeat domain, and thioredoxin.

[0235] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents or antibodies can be used in any one of a number of conjugated (i.e. an immunoconjugate or radioconjugate) or non-conjugated forms. In certain embodiments, the antibodies can be used in a non-conjugated form to harness the subject's natural defense mechanisms including complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cellular toxicity to eliminate malignant or cancer cells.

[0236] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody or polypeptide) is conjugated to a cytotoxic agent. In some embodiments, the cytotoxic agent is a chemotherapeutic agent

including, but not limited to, methotrexate, adriamicin, doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents. In some embodiments, the cytotoxic agent is an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof, including, but not limited to, diphtheria A chain, non-binding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), Momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, Sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. In some embodiments, the cytotoxic agent is a radioisotope to produce a radioconjugate or a radioconjugated antibody. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies including, but not limited to, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re and ^{212}Bi. Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as calicheamicins, maytansinoids, trichothecenes, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, can also be used. Conjugates of an antibody and cytotoxic agent can be made using a variety of bifunctional protein-coupling agents including, but not limited to, N-succinimidyl-3-(2-pyridyidithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene).

III. Polynucleotides

[0237] In certain embodiments, the invention encompasses polynucleotides comprising polynucleotides that encode a polypeptide (or a fragment of a polypeptide) that specifically binds VEGF, DLL4, both VEGF and DLL4. The term "polynucleotides that encode a polypeptide" encompasses a polynucleotide which includes only coding sequences for the polypeptide, as well as a polynucleotide which includes additional coding and/or non-coding sequences. For example, in some embodiments, the invention provides a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes an antibody to human VEGF or encodes a fragment of such an antibody (e.g., a fragment comprising the antigen-binding site). In some embodiments, the invention provides a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes an antibody to human DLL4 or encodes a fragment of such an antibody (e.g., a fragment comprising the antigen-binding site). The polynucleotides of the invention can be in the form of RNA or in the form of DNA. DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA; and can be double-stranded or single-stranded, and if single-stranded can be the coding strand or non-coding (anti-sense) strand.

[0238] In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, and SEQ ID NO: 64. In some embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78.

[0239] In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide having a nucleotide sequence at least about 80% identical, at least about 85% identical, at least about 90% identical, at least about 95% identical, and in some embodiments, at least about 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78. In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide having a nucleotide sequence at least about 80% identical, at least about 85% identical, at least about 90% identical, at least about 95% identical, and in some embodiments, at least about 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78. Also provided is a polynucleotide that comprises a polynucleotide that hybridizes to SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID

NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78. In certain embodiments, the hybridization is under conditions of high stringency.

[0240] In certain embodiments, the polynucleotides comprise the coding sequence for the mature polypeptide fused in the same reading frame to a polynucleotide which aids, for example, in expression and secretion of a polypeptide from a host cell (e.g., a leader sequence which functions as a secretory sequence for controlling transport of a polypeptide from the cell). The polypeptide having a leader sequence is a preprotein and can have the leader sequence cleaved by the host cell to form the mature form of the polypeptide. The polynucleotides can also encode for a proprotein which is the mature protein plus additional 5' amino acid residues. A mature protein having a prosequence is a proprotein and is an inactive form of the protein. Once the prosequence is cleaved an active mature protein remains.

[0241] In certain embodiments, the polynucleotides comprise the coding sequence for the mature polypeptide fused in the same reading frame to a marker sequence that allows, for example, for purification of the encoded polypeptide. For example, the marker sequence can be a hexa-histidine tag supplied by a pQE-9 vector to provide for purification of the mature polypeptide fused to the marker in the case of a bacterial host, or the marker sequence can be a hemagglutinin (HA) tag derived from the influenza hemagglutinin protein when a mammalian host (e.g., COS-7 cells) is used. In some embodiments, the marker sequence is a FLAG-tag, a peptide of sequence DYKDDDDK (SEQ ID NO:45) which can be used in conjunction with other affinity tags.

[0242] The present invention further relates to variants of the hereinabove described polynucleotides encoding, for example, fragments, analogs, and/or derivatives.

[0243] In certain embodiments, the present invention provides polynucleotides comprising polynucleotides having a nucleotide sequence at least about 80% identical, at least about 85% identical, at least about 90% identical, at least about 95% identical, and in some embodiments, at least about 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody), or fragment thereof, described herein.

[0244] As used herein, the phrase a polynucleotide having a nucleotide sequence at least, for example, 95% "identical" to a reference nucleotide sequence is intended to mean that the nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that the polynucleotide sequence can include up to five point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference sequence can be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 5% of the total nucleotides in the reference sequence can be inserted into the reference sequence. These mutations of the reference sequence can occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions,

interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

[0245] The polynucleotide variants can contain alterations in the coding regions, non-coding regions, or both. In some embodiments, a polynucleotide variant contains alterations which produce silent substitutions, additions, or deletions, but does not alter the properties or activities of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant comprises silent substitutions that results in no change to the amino acid sequence of the polypeptide (due to the degeneracy of the genetic code). Polynucleotide variants can be produced for a variety of reasons, for example, to optimize codon expression for a particular host (i.e., change codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as E. coli). In some embodiments, a polynucleotide variant comprises at least one silent mutation in a non-coding or a coding region of the sequence.

[0246] In some embodiments, a polynucleotide variant is produced to modulate or alter expression (or expression levels) of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant is produced to increase expression of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant is produced to decrease expression of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant has increased expression of the encoded polypeptide as compared to a parental polynucleotide sequence. In some embodiments, a polynucleotide variant has decreased expression of the encoded polypeptide as compared to a parental polynucleotide sequence.

[0247] In some embodiments, at least one polynucleotide variant is produced (without changing the amino acid sequence of the encoded polypeptide) to increase production of a heteromultimeric molecule. In some embodiments, at least one polynucleotide variant is produced (without changing the amino acid sequence of the encoded polypeptide) to increase production of a bispecific antibody.

[0248] In certain embodiments, the polynucleotides are isolated. In certain embodiments, the polynucleotides are substantially pure.

[0249] Vectors and cells comprising the polynucleotides described herein are also provided. In some embodiments, an expression vector comprises a polynucleotide molecule. In some embodiments, a host cell comprises an expression vector comprising the polynucleotide molecule. In some embodiments, a host cell comprises a polynucleotide molecule.

IV. Methods of use and pharmaceutical compositions

[0250] The -binding agents (including polypeptides and antibodies) of the invention that bind (e.g., specifically bind) VEGF and/or DLL4 are useful in a variety of applications including, but not limited to, therapeutic treatment methods, such as the treatment of cancer. In certain embodiments, the agents are useful for inhibiting VEGF activity, inhibiting DLL4-induced Notch signaling, inhibiting tumor growth, reducing tumor volume, reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, reducing the

tumorigenicity of a tumor, modulating angiogenesis, and/or inhibiting angiogenesis. The methods of use may be *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo*. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of human VEGF. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of human DLL4. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of both VEGF and DLL4.

[0251] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are used in the treatment of a disease associated with angiogenesis, i.e. increased angiogenesis and/or aberrant angiogenesis. In certain embodiments, the disease is a disease dependent upon angiogenesis. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are used in the treatment of disorders characterized by increased levels of stem cells and/or progenitor cells.

[0252] The present invention provides methods for inhibiting growth of a tumor using the VEGF/DLL4-binding agents or antibodies described herein. In certain embodiments, the method of inhibiting growth of a tumor comprises contacting a tumor cell with a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) *in vitro*. For example, an immortalized cell line or a cancer cell line is cultured in medium to which is added an anti-VEGF antibody, an anti-DLL4 antibody, or an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to inhibit tumor cell growth. In some embodiments, tumor cells are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and cultured in medium to which is added a VEGF/DLL4-binding agent to inhibit tumor cell growth.

[0253] In some embodiments, the method of inhibiting growth of a tumor comprises contacting a tumor or tumor cells with a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) *in vivo*. In certain embodiments, contacting a tumor or tumor cell with a VEGF/DLL4-binding agent is undertaken in an animal model. For example, an anti-VEGF antibody, an anti-DLL4 antibody, or an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody may be administered to an immunocompromised host animal (e.g., NOD/SCID mice) which has a tumor xenograft. In some embodiments, tumor cells and/or cancer stem cells are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and injected into an immunocompromised host animal (e.g., NOD/SCID mice) that is then administered a VEGF/DLL4-binding agent to inhibit tumor cell growth. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is administered at the same time or shortly after introduction of tumorigenic cells into the animal to prevent tumor growth ("preventative model"). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is administered as a therapeutic after tumors have grown to a specified size ("therapeutic model"). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4.

[0254] In certain embodiments, the method of inhibiting growth of a tumor comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent. In certain embodiments, the subject is a human. In certain embodiments, the subject has a tumor or has had a tumor which was removed. In certain embodiments, the tumor comprises cancer stem cells. In certain embodiments, the

frequency of cancer stem cells in the tumor is reduced by administration of the VEGF/DLL4-binding agent. The invention also provides a method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, comprising contacting the tumor with an effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody). In some embodiments, a method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor in a subject, comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent.

[0255] In some embodiments, the tumor is a solid tumor. In certain embodiments, the tumor is a tumor selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, pancreatic tumor, lung tumor, ovarian tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor. In certain embodiments, the tumor is a colorectal tumor or a colon tumor. In certain embodiments, the tumor is an ovarian tumor. In some embodiments, the tumor is a lung tumor. In certain embodiments, the tumor is a pancreatic tumor. In certain embodiments, the tumor is a breast tumor.

[0256] The present invention further provides methods for treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent to a subject. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds VEGF, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds DLL4, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds VEGF, interferes with VEGF/VEGF receptor interactions, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds DLL4, interferes with DLL4/Notch interactions, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds both VEGF and DLL4, interferes with VEGF/VEGF receptor interactions and with DLL4/Notch interactions, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds DLL4, and reduces the frequency of cancer stem cells in the cancer.

[0257] The present invention provides methods of treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent to a subject (e.g., a subject in need of treatment). In certain embodiments, the subject is a human. In certain embodiments, the subject has a cancerous tumor. In certain embodiments, the subject has had a tumor removed.

[0258] The subject's cancer/tumor, may, in some embodiments, be refractory to certain treatment(s). As a non-limiting example, the subject's cancer (or tumor) may be chemorefractory. In certain embodiments, the subject's cancer may be resistant to anti-VEGF therapy or anti-DLL4 therapy, or both.

[0259] In certain embodiments, the cancer is a cancer selected from the group consisting of colorectal cancer, pancreatic cancer, lung cancer, ovarian cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate

cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, and head and neck cancer. In certain embodiments, the cancer is ovarian cancer. In certain embodiments, the cancer is colorectal cancer or colon cancer. In certain embodiments, the cancer is pancreatic cancer. In certain embodiments, the cancer is breast cancer. In certain embodiments, the cancer is prostate cancer. In certain embodiments, the cancer is lung cancer. In some embodiments, the cancer is a hematologic cancer such as leukemia or lymphoma. In some embodiments, the leukemia or lymphoma is a B-cell leukemia or lymphoma. In some embodiments, the leukemia or lymphoma is a T-cell leukemia or lymphoma. In some embodiments the hematologic cancer is acute myelogenous leukemia, Hodgkin lymphoma, non-Hodgkins's lymphoma, acute lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, cutaneous T-cell lymphoma, or T-cell acute lymphoblastic leukemia.

[0260] The invention also provides methods of treating a disease or disorder in a subject, wherein the disease or disorder is associated with angiogenesis. In some embodiments, the disease or disorder is associated with aberrant angiogenesis. In some embodiments, the disease or disorder is associated with increased angiogenesis. Thus, the present invention provides methods for modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of any of the VEGF/DLL4-binding agents described herein. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds human DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds human DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds human VEGF and human DLL4.

[0261] Methods of treating a disease or disorder in a subject, wherein the disease or disorder is characterized by an increased level of stem cells and/or progenitor cells are further provided. In some embodiments, the treatment methods comprise administering a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent, polypeptide, or antibody to the subject.

[0262] In certain embodiments of any of the methods described herein, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY

(SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and second antigen-binding site which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-

binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0263] In certain embodiments of any of the methods described herein, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64, and a first and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0264] In some embodiments of any of the methods described herein, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an anti-VEGF antibody. In some embodiments, the anti-VEGF antibody is antibody 219R45. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is antibody 21R79. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is antibody 21R75. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 219R45. In some embodiments, the

VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21M18. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0265] The present invention further provides pharmaceutical compositions comprising the binding agents described herein. In certain embodiments, the pharmaceutical compositions further comprise a pharmaceutically acceptable vehicle. These pharmaceutical compositions find use in inhibiting tumor growth and/or treating cancer in a subject (e.g., a human patient).

[0266] In certain embodiments, the invention provides pharmaceutical compositions comprising bispecific antibodies, wherein at least about 90%, at least about 95%, at least about 98%, at least about 99% of the antibodies in the composition are bispecific antibodies or heterodimeric antibodies. In certain embodiments, the bispecific antibodies are IgG (e.g., IgG2 or IgG1) antibodies. In certain embodiments, less than about 10%, less than about 5%, less than about 2% or less than about 1% of the total antibodies in the compositions are monospecific antibodies or homodimeric antibodies. In certain embodiments, the antibodies in the composition are at least about 98% heterodimeric.

[0267] In certain embodiments, formulations are prepared for storage and use by combining a purified antibody or agent of the present invention with a pharmaceutically acceptable vehicle (e.g., a carrier or excipient). Suitable pharmaceutically acceptable vehicles include, but are not limited to, non-toxic buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, phenol, butyl or benzyl alcohol, alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol, and m-cresol; low molecular weight polypeptides (e.g., less than about 10 amino acid residues); proteins such as

serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; carbohydrates such as monosaccharides, disaccharides, glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes such as Zn-protein complexes; and non-ionic surfactants such as TWEEN or polyethylene glycol (PEG). (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition*, 2005, University of the Sciences, Philadelphia, PA).

[0268] The pharmaceutical compositions of the present invention can be administered in any number of ways for either local or systemic treatment. Administration can be topical by epidermal or transdermal patches, ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids, and powders; pulmonary by inhalation or insufflation of powders or aerosols, including by nebulizer, intratracheal, and intranasal; oral; or parenteral including intravenous, intraarterial, intratumoral, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular (e.g., injection or infusion), or intracranial (e.g., intrathecal or intraventricular).

[0269] The therapeutic formulation can be in unit dosage form. Such formulations include tablets, pills, capsules, powders, granules, solutions or suspensions in water or non-aqueous media, or suppositories. In solid compositions such as tablets the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical carrier. Conventional tableting ingredients include corn starch, lactose, sucrose, sorbitol, talc, stearic acid, magnesium stearate, dicalcium phosphate or gums, and diluents (e.g., water). These can be used to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention, or a non-toxic pharmaceutically acceptable salt thereof. The solid preformulation composition is then subdivided into unit dosage forms of a type described above. The tablets, pills, etc. of the formulation or composition can be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner composition covered by an outer component. Furthermore, the two components can be separated by an enteric layer that serves to resist disintegration and permits the inner component to pass intact through the stomach or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials include a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol and cellulose acetate.

[0270] The VEGF/DLL4-binding agents or antibodies described herein can also be entrapped in microcapsules. Such microcapsules are prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles and nanocapsules) or in macroemulsions as described in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition*, 2005, University of the Sciences in Philadelphia, PA.

[0271] In certain embodiments, pharmaceutical formulations include a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) of the present invention complexed with liposomes. Methods to produce liposomes are known to those of skill in the art. For example, some liposomes can be generated by reverse phase evaporation with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes can be extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

[0272] In certain embodiments, sustained-release preparations can be produced. Suitable examples of sustained-release preparations include semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody), where the matrices are in the form of shaped articles (e.g., films or microcapsules). Additional examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels such as poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) or poly(vinyl alcohol), polylactides, copolymers of L-glutamic acid and 7 ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

[0273] In certain embodiments, in addition to administering a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody), the method or treatment further comprises administering at least one additional therapeutic agent. An additional therapeutic agent can be administered prior to, concurrently with, and/or subsequently to, administration of the VEGF/DLL4-binding agent. Pharmaceutical compositions comprising a VEGF/DLL4-binding agent and the additional therapeutic agent(s) are also provided. In some embodiments, the at least one additional therapeutic agent comprises 1, 2, 3, or more additional therapeutic agents.

[0274] Combination therapy with at least two therapeutic agents often uses agents that work by different mechanisms of action, although this is not required. Combination therapy using agents with different mechanisms of action may result in additive or synergetic effects. Combination therapy may allow for a lower dose of each agent than is used in monotherapy, thereby reducing toxic side effects and/or increasing the therapeutic index of at least one of the agents. Combination therapy may decrease the likelihood that resistant cancer cells will develop. In some embodiments, combination therapy comprises a therapeutic agent that primarily affects (e.g., inhibits or kills) non-tumorigenic cells and a therapeutic agent that primarily affects (e.g., inhibits or kills) tumorigenic CSCs.

[0275] Useful classes of therapeutic agents include, for example, antitubulin agents, auristatins, DNA minor groove binders, DNA replication inhibitors, alkylating agents (e.g., platinum complexes such as cisplatin, mono(platinum), bis(platinum) and tri-nuclear platinum complexes and carboplatin), anthracyclines, antibiotics, antifolates, antimetabolites, chemotherapy sensitizers, duocarmycins, etoposides, fluorinated pyrimidines, ionophores, lexitropsins, nitrosoureas, platinols, purine

antimetabolites, puromycins, radiation sensitizers, steroids, taxanes, topoisomerase inhibitors, vinca alkaloids, or the like. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an alkylating agent, an antimetabolite, an antimitotic, a topoisomerase inhibitor, or an angiogenesis inhibitor. In some embodiments, the second therapeutic agent is a platinum complex such as carboplatin or cisplatin. In some embodiments, the additional therapeutic agent is a platinum complex in combination with a taxane.

[0276] Therapeutic agents that may be administered in combination with the VEGF/DLL4-binding agents include chemotherapeutic agents. Thus, in some embodiments, the method or treatment involves the administration of an anti-VEGF-binding agent or antibody of the present invention in combination with a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents. In some embodiments, the method or treatment involves the administration of an anti-DLL4-binding agent or antibody of the present invention in combination with a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents. In some embodiments, the method or treatment involves the administration of a bispecific antibody of the present invention that binds VEGF and DLL4 in combination with a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents.

[0277] Chemotherapeutic agents useful in the instant invention include, but are not limited to, alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide (CYTOXAN); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphaoramide and trimethylolomelamime; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabicin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytosine arabinoside, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenishers such as folinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; etoglucid;

gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK; razoxane; sizofuran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside (Ara-C); taxoids, e.g. paclitaxel (TAXOL) and docetaxel (TAXOTERE); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; ibandronate; CPT11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine (XELODA); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Chemotherapeutic agents also include anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including, for example, tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (FARESTON); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. In certain embodiments, the second therapeutic agent is cisplatin. In certain embodiments, the second therapeutic agent is carboplatin. In certain embodiments, the second therapeutic agent is paclitaxel.

[0278] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is a topoisomerase inhibitor. Topoisomerase inhibitors are chemotherapeutic agents that interfere with the action of a topoisomerase enzyme (e.g., topoisomerase I or II). Topoisomerase inhibitors include, but are not limited to, doxorubicin HCl, daunorubicin citrate, mitoxantrone HCl, actinomycin D, etoposide, topotecan HCl, teniposide (VM-26), and irinotecan, as well as pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of these. In certain embodiments, the second therapeutic agent is irinotecan.

[0279] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is an anti-metabolite. An anti-metabolite is a chemical with a structure that is similar to a metabolite required for normal biochemical reactions, yet different enough to interfere with one or more normal functions of cells, such as cell division. Anti-metabolites include, but are not limited to, gemcitabine, fluorouracil, capecitabine, methotrexate sodium, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, cytosine arabinoside, thioguanine, 5-azacytidine, 6-mercaptopurine, azathioprine, 6-thioguanine, pentostatin, fludarabine phosphate, and cladribine, as well as pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of these. In certain embodiments, the second therapeutic agent is gemcitabine.

[0280] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is an antimitotic agent, including, but not limited to, agents that bind tubulin. In some embodiments, the agent is a taxane. In certain embodiments, the agent is paclitaxel or docetaxel, or a pharmaceutically acceptable salt, acid, or derivative of paclitaxel or docetaxel. In certain embodiments, the agent is paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE),

albumin-bound paclitaxel (ABRAXANE), DHA-paclitaxel, or PG-paclitaxel. In certain alternative embodiments, the antimitotic agent comprises a vinca alkaloid, such as vincristine, binblastine, vinorelbine, or vindesine, or pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives thereof. In some embodiments, the antimitotic agent is an inhibitor of kinesin Eg5 or an inhibitor of a mitotic kinase such as Aurora A or Plk1. In certain embodiments, where the chemotherapeutic agent administered in combination with a VEGF/DLL4-binding agent is an anti-mitotic agent, the cancer or tumor being treated is breast cancer or a breast tumor.

[0281] In some embodiments, a second therapeutic agent comprises an agent such as a small molecule. For example, treatment can involve the combined administration of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g. an antibody) of the present invention with a small molecule that acts as an inhibitor against additional tumor-associated proteins including, but not limited to, EGFR, ErbB2, HER2, and/or VEGF. In certain embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule that inhibits a cancer stem cell pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule inhibitor of the Notch pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule inhibitor of the Wnt pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule inhibitor of the BMP pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule that inhibits β-catenin signaling.

[0282] In some embodiments, a second therapeutic agent comprises a biological molecule, such as an antibody. For example, treatment can involve the combined administration of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g. an antibody) of the present invention with other antibodies against additional tumor-associated proteins including, but not limited to, antibodies that bind EGFR, ErbB2, HER2, and/or VEGF. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that is an anti-cancer stem cell marker antibody. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that binds a component of the Notch pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that binds a component of the Wnt pathway. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that inhibits a cancer stem cell pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody inhibitor of the Notch pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody inhibitor of the Wnt pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody inhibitor of the BMP pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that inhibits β-catenin signaling. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that is an angiogenesis inhibitor or modulator (e.g., an anti-VEGF or VEGF receptor antibody). In certain embodiments, the second therapeutic agent is bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX), or cetuximab (ERBITUX). Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously.

[0283] Furthermore, treatment with a VEGF/DLL4-binding agent described herein can include combination treatment with other biologic molecules, such as one or more cytokines (e.g., lymphokines, interleukins, tumor necrosis factors, and/or growth factors) or can be accompanied by surgical removal of tumors, cancer cells, or any other therapy deemed necessary by a treating physician.

[0284] In certain embodiments, the treatment involves the administration of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g. an antibody) of the present invention in combination with radiation therapy. Treatment with a VEGF/DLL4-binding agent can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of radiation therapy. Dosing schedules for such radiation therapy can be determined by the skilled medical practitioner.

[0285] It will be appreciated that the combination of a VEGF/DLL4-binding agent and an additional therapeutic agent may be administered in any order or concurrently. Treatment with a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of chemotherapies. Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents can be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in *The Chemotherapy Source Book, 4th Edition*, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

[0286] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent will be administered to patients that have previously undergone treatment with a second therapeutic agent. In certain other embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent and a second therapeutic agent will be administered substantially simultaneously or concurrently. For example, a subject may be given a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) while undergoing a course of treatment with a second therapeutic agent (e.g., chemotherapy). In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 1 year of the treatment with a second therapeutic agent. In certain alternative embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 10, 8, 6, 4, or 2 months of any treatment with a second therapeutic agent. In certain other embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 4, 3, 2, or 1 weeks of any treatment with a second therapeutic agent. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 5, 4, 3, 2, or 1 days of any treatment with a second therapeutic agent. It will further be appreciated that the two (or more) agents or treatments may be administered to the subject within a matter of hours or minutes (i.e., substantially simultaneously).

[0287] For the treatment of a disease, the appropriate dosage of an VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) of the present invention depends on the type of disease to be treated, the severity and course of the disease, the responsiveness of the disease, whether the VEGF/DLL4-binding agent or antibody is

administered for therapeutic or preventative purposes, previous therapy, the patient's clinical history, and so on, all at the discretion of the treating physician. The VEGF/DLL4-binding agent or antibody can be administered one time or as a series of treatments spread over several days to several months, or until a cure is effected or a diminution of the disease state is achieved (e.g., reduction in tumor size). Optimal dosing schedules can be calculated from measurements of drug accumulation in the body of the patient and will vary depending on the relative potency of an individual antibody or agent. The administering physician can determine optimum dosages, dosing methodologies, and repetition rates. In certain embodiments, dosage of a VEGF/DLL4-binding agent or antibody is from about 0.01μg to about 100mg/kg of body weight, from about 0.1μg to about 100mg/kg of body weight, from about 1μg to about 100mg/kg of body weight, from about 1mg to about 100mg/kg of body weight, about 1mg to about 80mg/kg of body weight from about 10mg to about 100mg/kg of body weight, from about 10mg to about 75mg/kg of body weight, or from about 10mg to about 50mg/kg of body weight. In certain embodiments, the dosage of the antibody or other VEGF/DLL4-binding agent is from about 0.1mg to about 20mg/kg of body weight. In certain embodiments, dosage can be given once or more daily, weekly, monthly, or yearly. In certain embodiments, the antibody or other VEGF/DLL4-binding agent is given once every week, once every two weeks, once every three weeks, or once every month.

[0288] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) may be administered at an initial higher "loading" dose, followed by one or more lower doses. In some embodiments, the frequency of administration may also change. In some embodiments, a dosing regimen may comprise administering an initial dose, followed by additional doses (or "maintenance" doses) once a week, once every two weeks, once every three weeks, or once every month. For example, a dosing regimen may comprise administering an initial loading dose, followed by a weekly maintenance dose of, for example, one-half of the initial dose. Or a dosing regimen may comprise administering an initial loading dose, followed by maintenance doses of, for example one-half of the initial dose every other week. Or a dosing regimen may comprise administering three initial doses for 3 weeks, followed by maintenance doses of, for example, the same amount every other week. Or a dosing regimen may comprise administering an initial dose followed by additional doses every 3 weeks or once a month. The treating physician can estimate repetition rates for dosing based on measured residence times and concentrations of the drug in bodily fluids or tissues. The progress of therapy can be monitored by conventional techniques and assays.

[0289] As is known to those of skill in the art, administration of any therapeutic agent may lead to side effects and/or toxicities. In some cases, the side effects and/or toxicities are so severe as to preclude administration of the particular agent at a therapeutically effective dose. In some cases, drug therapy must be discontinued, and other agents may be tried. However, many agents in the same therapeutic class often display similar side effects and/or toxicities, meaning that the patient either has to stop therapy, or if possible, suffer from the unpleasant side effects associated with the therapeutic agent.

[0290] Side effects from therapeutic agents may include, but are not limited to, hives, skin rashes, itching, nausea, vomiting, decreased appetite, diarrhea, chills, fever, fatigue, muscle aches and pain, headaches, low blood pressure, high blood pressure, hypokalemia, low blood counts, bleeding, and cardiac problems.

[0291] Thus, one aspect of the present invention is directed to methods of treating cancer in a patient comprising administering an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen, which may reduce side effects and/or toxicities associated with administration of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody. As used herein, "intermittent dosing" refers to a dosing regimen using a dosing interval of more than once a week, e.g., dosing once every 2 weeks, once every 3 weeks, once every 4 weeks, etc. In some embodiments, a method for treating cancer in a human patient comprises administering to the patient an effective dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody according to an intermittent dosing regimen. In some embodiments, a method for treating cancer in a human patient comprises administering to the patient an effective dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody according to an intermittent dosing regimen, and increasing the therapeutic index of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises administering an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to the patient, and administering subsequent doses of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody about once every 2 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises administering an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to the patient, and administering subsequent doses of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody about once every 3 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises administering an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to the patient, and administering subsequent doses of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody about once every 4 weeks.

[0292] In some embodiments, the subsequent doses in an intermittent dosing regimen are about the same amount or less than the initial dose. In other embodiments, the subsequent doses are a greater amount than the initial dose. As is known by those of skill in the art, doses used will vary depending on the clinical goals to be achieved. In some embodiments, the initial dose is about 0.25mg/kg to about 20mg/kg. In some embodiments, the initial dose is about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 0.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 1mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 2.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 7.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 10mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 12.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 15mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 20mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 0.25mg/kg to about 15mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses

are about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 0.5mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 1mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 2.5mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 5mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 7.5mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 10mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 12.5mg/kg.

[0293] In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 2.5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 2.5 mg/kg once every 2 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 5 mg/kg once every 2 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 2.5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 2.5 mg/kg once every 3 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 5 mg/kg once every 3 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 2.5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 2.5 mg/kg once every 4 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 5 mg/kg once every 4 weeks. In certain embodiments, the initial dose and the maintenance doses are different, for example, the initial dose is about 5mg/kg and the subsequent doses are about 2.5mg/kg. In certain embodiments, an intermittent dosing regimen may comprise a loading dose, for example, the initial dose is about 20mg/kg and the subsequent doses are about 2.5mg/kg or about 5mg/kg administered once every 2 weeks, once every 3 weeks, or once every 4 weeks.

[0294] Another aspect of the present invention is directed to methods for reducing toxicity of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody in a human patient comprises administering to the patient the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen. Another aspect of the present invention is directed to methods for reducing side effects of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody in a human patient comprises administering to the patient the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen. Another aspect of the present invention is directed to methods for increasing the therapeutic index of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody in a human patient comprises administering to the patient the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen.

[0295] The choice of delivery method for the initial and subsequent doses is made according to the ability of the animal or human patient to tolerate introduction of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody into the body. Thus, in any of the aspects and/or embodiments described herein, the administration of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody may be by intravenous injection or intravenously. In some embodiments, the administration is by intravenous infusion. In any of the aspects and/or embodiments described herein, the administration of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody may be by a non-intravenous route.

V. Kits comprising VEGF/DLL4-binding agents

[0296] The present invention provides kits that comprise the VEGF/DLL4-binding agents (e.g., antibodies) described herein and that can be used to perform the methods described herein. In certain embodiments, a kit comprises at least one purified antibody against VEGF and/or DLL4 in one or more containers. In some embodiments, the kits contain all of the components necessary and/or sufficient to perform a detection assay, including all controls, directions for performing assays, and any necessary software for analysis and presentation of results. One skilled in the art will readily recognize that the disclosed VEGF/DLL4-binding agents of the present invention can be readily incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

[0297] Further provided are kits comprising a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody), as well as at least one additional therapeutic agent. In certain embodiments, the second (or more) therapeutic agent is a chemotherapeutic agent. In certain embodiments, the second (or more) therapeutic agent is an angiogenesis inhibitor.

[0298] Embodiments of the present disclosure can be further defined by reference to the following non-limiting examples, which describe in detail preparation of certain antibodies of the present disclosure and methods for using antibodies of the present disclosure. It will be apparent to those skilled in the art that many modifications, both to materials and methods, may be practiced without departing from the scope of the present disclosure.

EXAMPLES

Example 1

Binding affinities of anti-VEGF/anti-DLL4 antibodies

[0299] The K_Ds of parental antibodies anti-VEGF 219R45 (IgG format), anti-DLL4 21R79 (IgG format), anti-DLL4 21M18 (IgG format) and bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 were determined using a Biacore 2000 system from Biacore LifeSciences (GE Healthcare). Recombinant human DLL4-Fc or mouse DLL4-Fc proteins were immobilized on CM5 carboxyl chips using standard amine-based chemistry (NHS/EDC) and blocked with ethanolamine. Recombinant human $VEGF_{165}$ or

mouse $VEGF_{165}$ were biotinylated and immobilized on streptavidin chips. The antibodies were serially diluted 2-fold from 100nM to 0.78nM in HBS-P (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005% v/v Polysorbate 20). For each antibody, all 8 dilutions were sequentially injected over a specific chip. Kinetic data were collected over time and were fit using the simultaneous global fit equation to yield affinity constants (K_D values) for each bispecific antibody.

Table 3

Antibody	hVEGF (nM)	mVEGF(nM)	hDLL4 (nM)	mDLL4 (nM)
219R45	0.67	22.9	NB	NB
21M18	NB	NB	<0.1	NB
21R79	NB	NB	<0.1	NB
219R45-MB-21M18	0.36	25.5	16	NB
219R45-MB-21R79	0.68	12.5	0.53	NB

[0300] As shown in Table 3, bispecific antibody 219R45-MB-21M18 had an affinity constant (K_D) for human VEGF of 0.36nM and a K_D for human DLL4 of 16nM. Bispecific antibody 219R45-MB-21R79 had a K_D for human VEGF of 0.68nM and a K_D for human DLL4 of 0.53nM. Both bispecific antibodies demonstrated weaker binding to mouse VEGF as compared to human VEGF and neither antibody bound mouse DLL4. Thus, both bispecific antibodies demonstrated similar binding affinity to human VEGF and 219R45-MB-21R79 demonstrated approximately 30-fold stronger binding to human DLL4 than 219R45-MB-21M18. Furthermore, bispecific antibody 219R45-MB-21R79 had a similar binding affinity to human VEGF despite the fact the bispecific antibody is monovalent for VEGF as compared to the bivalent parental antibody.

[0301] Several additional anti-DLL4 antibodies were identified that had binding affinities intermediate to the K_Ds of 21M18 and 21R79. Two of these anti-DLL4 antibodies were used to produce anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21R75 and 219R45-MB-21R83. Using the Biacore 2000 system as described above, the K_Ds of the bispecific antibodies 219R45-MB-21R75 and 219R45-MB-21R83 to human DLL4 were determined. A comparison of the binding affinity to human DLL4 of these four anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies is shown in Table 4.

[0302] The CDRs for anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 are shown in Figure 1A. The heavy chain and light chain variable region SEQ ID NOs are shown in Figure 1B and the heavy chain and light chain SEQ ID NOs (with and without signal sequence) are shown in Figure 1C.

[0303] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 comprises a (a) heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:75 deposited with American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ , (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

[0304] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79 comprises a (a) heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:31 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

[0305] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R83 comprises (a) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:72 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on _____ and assigned designation number PTA-____, (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

[0306] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R75 comprises (a) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:74 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

Table 4

Antibody	Heavy chain CDR2	hDLL4 (nM)
219R45-MB-21M18	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	16.00
219R45-MB-21R79	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	0.53

219R45-MB-21R75	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	5.10
219R45-MB-21R83	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	1.30

Example 2

HTRF Assay for simultaneous binding of bispecific antibodies to human VEGF and human DLL4

[0307] To characterize the binding capabilities of certain antibodies and/or antibody mixtures to both VEGF and DLL4, homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) assays were performed. Antibodies tested were anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, parental antibodies 219R45 (anti-VEGF), 21M18 (anti-DLL4), 21R79 (anti-DLL4), a combination of 219R45 and 21M18, or a combination of 219R45 and 21R79. The antibodies or antibody mixtures were serially diluted 2-fold from 3000nM to 2.9nM in binding buffer (1X PBS, 0.1% gelatin, 0.1% Polysorbate 20, 400mM potassium fluoride) and placed in a white 96-well plate. An equal volume of solution containing 4μg/ml of d2-labeled hDLL4-Fc and 21.4ng/ml Europium crypate-labeled $hVEGF_{165}$ was added to each well for a final volume of 100μl (final concentrations of acceptor and donor fluorophores were 2μg/ml and 10.7ng/ml, respectively). The assay plates were incubated for 2 hours to overnight and read on a SpectraMax M5e Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) at an excitation wavelength of 314nm.

[0308] As shown in Figure 2, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, were able to bind both hVEGF and hDLL4 simultaneously. Importantly, neither of the combinations of the parental antibodies (i.e., 219R45 and 21M18 or 219R45 and 21R79) was able to bind VEGF and DLL4 simultaneously. These results clearly demonstrate that the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 are capable of functioning differently than just a mixture of the two individual antibodies.

Example 3

Inhibition of HUVEC proliferation by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies

[0309] HUVEC cells were obtained from Lonza (Walkersville MD) and cultured in growth media (M199, 10% heat-inactivated FBS (HI-FBS), 50μg/ml EGS, 1X heparin, 1mM L-glutamine). For the HUVEC proliferation assay, a 96-well plate was pre-coated with 50μl of 10μg/ml rat tail collagen type I solution (collagen I in 0.02N acetic acid) and incubated at 4°C overnight. After incubation, the plate was thoroughly aspirated to remove unbound collagen I solution and washed once with 200μl DPBS. The HUVEC cells were removed from the surface of the growth flasks using an endothelial cell subclone reagent and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes at 4°C. The cells were resuspended in starvation/assay medium (M199 and 2% HI-FBS, 1X heparin, 5U/ml heparin-glutamine) at a density of 10^5 cells/ml. The cells were seeded into the collagen-coated assay plate at 5000 cells/well, 50ul/well. The cells were

incubated for 3 hours at 37°C, washed one time, refed with 100ul assay media, and incubated overnight at 37°C. The next day, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, parental antibody 219R45, or control antibody LZ1 were prepared in a mixture with human VEGF (R&D Biosystems, Minneapolis MN). The antibodies were serially diluted 5-fold from 20μM to 0.25nM in assay buffer in combination with hVEGF (final concentration 5ng/ml). The mixture was pre-incubated at 37°C for 2 hours. The medium was removed from the assay plate, and 100μl of the antibody/hVEGF mixture was added to each well. After 3-4 days incubation, medium was removed and a fresh aliquot of the antibody/hVEGF mixture was added to each well and allowed to incubate for another 4 days. On day 7, 20μl of Alamar Blue reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to each well and incubated at 37°C for 5-6 hours. The plate was read with a SpectraMax M5e Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) using a excitation wavelength of 539nm and an emission wavelength of 590nm.

[0310] As shown in Figure 3, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, as well as parental anti-VEGF antibody 219R45 inhibited HUVEC proliferation. These results demonstrated that the bispecific antibodies were capable of inhibiting VEGF-induced proliferation of HUVEC cells.

Example 4

Inhibition of DLL4-induced Notch signalling by bispecific antibodies

[0311] Human PC3 cells were transfected with an expression vector encoding a full-length human Notch2 receptor and a firefly luciferase reporter vector (8xCBF-luciferase reporter) that is responsive to Notch signaling. The cells were also transfected with a Renilla luciferase reporter (Promega, Madison WI) as an internal control for transfection efficiency. Purified human DLL4 protein was coated onto 96-well plates at 100ng/well and Notch2-expressing PC3-luc cells were added to the wells. Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, parental anti-DLL4 antibodies 21M18, 21R79 or a control antibody LZ1 were serially diluted 5-fold from 20ug/ml to 0.064ug/ml, added to the appropriate wells, and incubated overnight. Luciferase activity was determined using a dual luciferase assay kit (Promega, Madison, WI) with firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity.

[0312] As shown in Figure 4, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79 and parental anti-DLL4 antibodies 21M18 and 21R79 inhibited DLL4-induced Notch signaling. Bispecific antibody 219R45-MB-21M18 inhibited DLL4-induced Notch signaling only at high antibody concentrations. These results demonstrated that bispecific antibody 219R45-MB-21R79, and to a lesser extent bispecific antibody 219R45-MB-21M18, were capable of inhibiting DLL4-induced Notch signaling. Thus, in combination with the results presented in Example 3, the anti-VEGF/anti-DLL4

bispecific antibodies 219R45-MB-21R79 and 219R45-MB-21M18 have demonstrated the ability to inhibit both VEGF-induced and DLL4-induced signaling and/or proliferation functions.

Example 5

Inhibition of tumor growth *in vivo* by a bispecific antibody in a human skin graft model

[0313] A human skin graft model has been reported which comprises a human skin graft and human tumor cells. A human skin graft is established and then human tumor cells are implanted into the skin graft, allowing the tumor cells to grow in an environment with human stroma and vasculature (Tahtis et al., 2003, Mol. Cancer Ther. 2:229-737). Human skin samples were obtained from neonatal foreskin tissue and grafted onto the lateral flank of NOD-SCID mice. After establishment of the skin graft, luciferase-labeled OMP-C8 colon tumor cells (20,000 cells) were injected intradermally into the human skin. Tumor growth was monitored by bioluminescence imaging using an IVIS imaging system (Caliper Life Sciences, Mountain View, CA). Tumors were allowed to grow until they reached 1.2 x 10^6 photons per second. Tumor-bearing mice (n = 6 mice/group) were randomized and treated with control Ab, anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18. Animals were treated once a week and antibodies were administered intraperitoneally at a dose of 25mg/kg. Tumor growth was monitored by bioluminescence imaging on the indicated days.

[0314] As shown in Figure 5, both anti-hDLL4 antibody 21M18 and anti-VEGF antibody bevacizumab inhibited tumor growth in this human skin graft/human tumor model. Furthermore, bispecific anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 was more effective than either the anti-DLL4 antibody or the anti-VEGF antibody alone. These data demonstrate the utility of simultaneously targeting DLL4 and VEGF with a bispecific antibody.

Example 6

Tumorigenicity of OMP-PN8 pancreatic tumor cells after treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies

[0315] Mice bearing OMP-PN8 pancreatic tumors were treated with control antibody (15 mg/kg), anti-hDLL4 antibody 21M18 (15 mg/kg), anti-VEGF antibody bevacizumab (15 mg/kg), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 or 219R45-MB-21R79 (30 mg/kg) with or without gemcitabine (70 mg/kg). Following four weeks of treatment, tumors were harvested, processed to single cell suspensions and the human tumor cells were purified by immunomagnetic depletion of murine cells. 90 human tumor cells from each treatment group were transferred to a new cohort of mice (n = 10 mice/group). Tumors were allowed to grow for 55 days without any treatment and tumor volumes were measured with electronic calipers.

[0316] Figure 6 shows the tumor volume from the individual mice in each group. Cells isolated from mice treated with anti-hDLL4 antibody 21M18 had greatly decreased tumorigenicity, 5 out of 10 mice had tumors, as compared to cells isolated from mice treated with control antibody where 9 out of 10 mice had tumors. The reduction in tumor growth frequency indicates a reduction in cancer stem cell frequency. In contrast, bevacizumab treatment resulted in no reduction of tumor growth frequency, 10 out of 10 mice had tumors. Similar to bevacizumab, treatment with gemcitabine as a single agent had no effect on tumor growth frequency as 10 out of 10 mice had tumors. The anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 both reduced tumor growth frequency (5 out of 10 mice had tumors and 4 out of 10 mice had tumors, respectively). Combination treatment with gemcitabine appeared to have no effect on tumor growth frequency. These data indicate that targeting DLL4 reduces cancer stem cell frequency while targeting VEGF alone does not. Importantly, these data indicate that the anti-CSC activity of the anti-DLL4 antibody is retained in a bispecific antibody.

Example 7

Bispecific Antibody ELISA

[0317] VEGF (ATGEN, South Korea) was coated onto Nunc maxisorb plates at 2ug/ml (100µl/well) and incubated overnight at 2-8°C. Bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 were diluted in blocking buffer (1x PBS, 0.1% gelatin, 0.1% Polysorbate-20, pH 7.4) containing 2µg/ml biotin-DLL4-hFc. The antibodies were serially diluted 3-fold from 500ng/ml to 0.008ng/ml. The antibody samples were incubated for 2 hours in blocking buffer containing the biotin-DLL4-hFc. After incubation, the antibody samples were transferred to the VEGF-coated assay plate (100 ul/well) and incubated for 2 hours. Streptavidin-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was added to each well and incubated for 1 hr. TMB substrate was added to the wells with a 10 minute color development and the reaction was stopped with 2M sulfuric acid. Absorbance was read at 450–650nm and the data analyzed using the 4-parameter fit within the Softmax Pro analysis program (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0318] Figure 7 shows the titration curves of bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 (open circles), 219R45-MB-21R79 (open squares), 219R45-MB-21R75 (open triangles), and 219R45-MB-21R83 (open diamonds) in comparison to a reference anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody (solid circles). Relative potencies for the bispecific antibodies as compared to the reference bispecific antibody are shown in Table 5.

Table 5

Antibody	Relative Potency (%)
219R45-MB-21M18	67
219R45-MB-21R79	501

219R45-MB-21R75	422
219R45-MB-21R83	222

[0319] Bispecific antibody 219R45-MB-21R79 was the most potent, about 7-fold more potent than 219R45-MB-21M18, which reflected the higher affinity of the 21R79 antigen-binding site.

Example 8

Bispecific Antibody Production

[0320] Bispecific antibodies were produced using a GS-CHO cell line. CHOK1SV cells (Lonza Biologics) were transfected via electroporation with the gene(s) of interest coupled with glutamine synthetase (GS) as the selectable marker. Transfectants and subclones were screened for antibody productivity and the high producers were selected for scaled-up production. Cells were grown using a fed-batch process and fed-batch bioreactors. Accumulated antibody in harvested cell culture fluid (HCCF) was isolated and purified using chromatography techniques.

[0321] Bispecific antibody cell lines 219R45-MB-21M18.010.017 and 219R45-MB-21R79.017.003 were cultured in 5L stirred tank bioreactors for 14 days. Cell line 219R45-MB-21M18.010.017 produced a final antibody titer of 3.0g/L and cell line 219R45-MB-21R79.017.003 produced a final antibody titer of 0.8g/L. Cell lines 219R45-MB-21R75.101 and 219R45-MB-21R83.113 were cultured in 25L WAVE bioreactor systems (GE Healthcare) using a fed-batch process that achieved final antibody titers of 0.4g/L. Bispecific antibody cell lines 219R45-MB-21M18AG.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014 and 219R45-MB-21R83AG.129.003 were cultured in 5 L stirred tank bioreactors for 14 - 15 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.138.007 produced a final antibody titer of 1.0 g/L after 14 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.038.009 produced a final antibody titer of 1.6 g/L after 14 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.142.002 produced a final antibody titer of 2.6 g/L after 14 days. Cell line 219R45-MB-21R79AG.072.014 produced a final antibody titer of 2.1 g/L after 15 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.038.009 produced a final antibody titer of 2.4 g/L after 15 days. Culture fluid was harvested by filtration from each of these four cell lines and subjected to Protein A affinity chromatography. The Protein A column was washed with a series of buffers and the antibodies were eluted using a low pH elution buffer. Initial characterization of the purity of the bispecific antibodies was performed using size exclusion chromatography (SEC-HPLC) and isoelectric focusing (IEF).

[0322] Size exclusion chromatography (SEC) was used to determine the purity of the antibody product. SEC is a well known chromatographic method in which molecules (e.g., antibodies) in solution are separated by their size. SEC may be used to distinguish an antibody product from aggregate and/or impurities, and to determine the percentage of the antibody product as compared to the total mixture. As

used herein, SEC does not distinguish between a homomeric antibody and a heterodimeric bispecific antibody.

[0323] Imaged capillary isoelectric focusing (icIEF) was used to determine identity and purity of the bispecific antibody heterodimers. Using icIEF, the charge isoforms of an antibody are separated according to their pI and the result is a "fingerprint" of the antibody's charge distribution. The icIEF method can also serve as a determination of purity by separating the bispecific antibody heterodimers by their distinct pI from any homodimer products or impurities.

[0324] Bispecific antibody samples were analyzed by icIEF on a ProteinSimple ICE280 instrument (ProteinSimple, Santa Clara, CA). For this analysis, a protein mixture is introduced into a capillary, high voltage is applied across the capillary and ampholytes establish a linear pH gradient along the length of the capillary. Under the influence of the electric field, the pI markers and the protein mixture both migrate the length of the capillary until a pH value is reached where the net charge is zero. Once focused, the ICE280 instrument uses whole-column imaging detection with a 280-nm UV camera to monitor the pattern of protein isoforms within the capillary. The resulting electropherogram is calibrated using internal pI markers and integrated to establish the respective percentage areas of the different charged isoforms of the protein mixture. The charge profiles from several anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies are shown in Figure 8. For this experiment, Protein A eluates were diluted with MilliQ water to a concentration of 6.6mg/ml. A total of 18µl of the sample was mixed with 100µL of 8M urea, 70µl of 0.5% methylcellulose, 8µL of 3-10 Pharmalyte, 2µl of high pI marker and 2µl of low pI marker to a final volume of 200µl. Table 6 shows the percentage of antibody product from cell lines 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, and 219R45-MB-21R83AG.129.003 after Protein A affinity chromatography as determined by SEC-HPLC. Table 6 also shows the percentage of heterodimeric antibodies from cell lines 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, and 219R45-MB-21R83AG.129.003 after Protein A affinity chromatography as analyzed by icIEF.

Table 6

Cell Line	Antibody Titer (g/L)	Purity by SEC (%)	Purity by IEF (% heterodimer)
219R45-MB-21M18.010.017	3.0	73.9	47.2
219R45-MB-21R79.017.002	0.8	79.3	72.5
219R45-MB-21R75.101	0.4	91.2	84.9
219R45-MB-21R83.113	0.4	91.8	91.4

219R45-MB-21M18.138.007	1.0	92.6	95.8
219R45-MB-21M18AG.038.009	1.6	89.6	89.0
219R45-MB-21M18AG.142.002	2.6	91.2	84.6
219R45-MB-21R79AG.072.014	2.1	87.8	84.9
219R45-MB-21R83AG.129.003	2.4	89.4	90.5

[0325] The purity of the bispecific antibody product can be increased further by additional chromatography steps. After Protein A affinity chromatography, the eluate fraction was held at a low pH for no less than 60 minutes at room temperature for viral inactivation. The antibody solution (Protein A column eluate, pH adjusted) was loaded onto a strong anion-exchange column. Product- and process-related impurities bound to the anion exchange chromatography resin and the flow-through fraction (antibody product) was collected. In some cases, purity was further improved by use of a multi-modal chromatography resin such as ceramic hydroxyapatite. In some cases, buffer exchange of the antibody product was undertaken using ultrafiltration and diafiltration techniques, after which excipients were added. The formulated antibody was sterile filtered into sterile containers and stored refrigerated or frozen. Purity of the bispecific antibodies was re-assessed using SEC-HPLC and IEF.

Table 7

Cell Line	Purity by SEC (%)	Purity by IEF (% heterodimer)
219R45-MB-21M18.010.017	98.9	98.5
219R45-MB-21R79.017.002	95.1	99.3
219R45-MB-21R75.101	97.2	98.2
219R45-MB-21R83.113	95.3	91.4
219R45-MB-21M18.138.007	98.1	100
219R45-MB-21M18AG.142.002	99.6	100
219R45-MB-21R79AG.072.014	98.2	100
219R45-MB-21R83AG.129.003	998.6	100

[0326] As shown in Table 7, the purification of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodieswith additional chromatography steps after Protein A resulted in isolation of antibody products that were 95% to about 99% pure as analyzed by SEC. Analysis by IEF determined that purified anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21M18.010.017 was 98.5% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R79.017.002 was 99.3% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R75.101 was 98.2% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R83.113

was 91.4% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21M18.138.007 was 100% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21M18AG.142.002 was 100% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R79AG.072.014 was 100% heterodimeric, and anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R83AG.129.003 was 100% heterodimeric. These results demonstrated that the anion-exchange chromatography step greatly increased the percentage of heterodimeric antibodies as compared to purification with Protein A chromatography alone. The addition of a multi-modal chromatography step such as ceramic hydroxyapatite can also improve monomeric purity (as determined by SEP-HPLC).

Example 9

Inhibition of OMP-C8 colon tumor growth *in vivo* tumor recurrence model

[0327] Single cell suspensions of OMP-C8 colon tumor xenografts (20,000 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 6-8 week old NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow for 33 days until they reached an average volume of 240mm^3. The mice were randomized (n = 10 per group) and treated with anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, a combination of antibodies 21M18 and bevacizumab, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79, or control antibody, all in combination with irinotecan. Antibodies and irinotecan were dosed weekly by injection into the intraperitoneal cavity. Antibodies 21M18 and bevacizumab were dosed at 7.5mg/kg, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 were dosed at 15mg/kg, and irinotecan was dosed at 45mg/kg. Irinotecan was dosed for four weeks, at which time, it was discontinued and the administration of the antibodies continued. Tumor growth was monitored and tumor volumes were measured with electronic calipers at the indicated time points. Data are expressed as mean ± S.E.M.

[0328] As shown in Figure 9, anti-hDLL4 antibody 21M18 continued to inhibit tumor growth after treatment with irinotecan was stopped. In contrast, anti-VEGF antibody bevacizumab was not able to inhibit regrowth of the tumor after irinotecan had been stopped. The combination of anti-DLL4 antibody 21M18 and anti-VEGF antibody bevacizumab resulted in greater inhibition of tumor regrowth than either agent alone. Furthermore, the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 was more effective at inhibiting tumor regrowth than the mixture of the two antibodies.

Example 10

Reduction in tumorigenicity of OMP-C8 colon tumors

[0329] Single cell suspensions of OMP-C8 colon tumor xenografts (20,000 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 6-8 week old NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow for 33

days until they reached an average volume of 300mm^3. The mice were randomized (n = 5 per group) and treated with anti-DLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, a combination of antibodies 21M18 and bevacizumab, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79, or control antibody, either in combination with irinotecan or without irinotecan. Antibodies and irinotecan were dosed weekly by injection into the intraperitoneal cavity. Antibodies 21M18 and bevacizumab were dosed at 7.5mg/kg, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 were dosed at 15mg/kg, and irinotecan was dosed at 45mg/kg. Tumors were harvested after 4 weeks, processed into single cell suspensions, and the human tumor cells were isolated. 150 tumor cells from each experimental group were injected subcutaneously into a new cohort of mice (n = 10 per group) and tumors were allowed to grow without treatment. Tumor growth was monitored and tumor volumes were measured with electronic calipers.

[0330] Individual tumor volumes at day 68 are shown in Figure 10. Anti-DLL4 antibody 21M18, the combination of 21M18 with anti-VEGF antibody bevacizumab, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, and irinotecan all reduced tumor growth frequency as single agents. In contrast, anti-VEGF bevacizumab as a single agent had no effect on tumor growth frequency as compared to the control antibody. In the groups treated with a combination of irinotecan and antibodies, the bispecific antibody 219R45-MB-21M18 had the greatest effect in reducing tumor growth frequency.

Example 11

Inhibition of OMP-C8 colon tumor growth *in vivo*

[0331] Single cell suspensions of OMP-C8 colon tumor xenografts (50,000 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 6-8 week old NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow for 21 days until they reached an average volume of 80mm^3. The mice were randomized (n = 8 per group) and treated with anti-DLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R83, or control antibody, either alone or in combination with irinotecan. Antibodies and irinotecan were dosed weekly by injection into the intraperitoneal cavity. Bevacizumab and bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, and 219R45-MB-21R83 were dosed at 15mg/kg, and irinotecan was dosed at 7.5mg/kg. Tumor growth was monitored and tumor volumes were measured with electronic calipers at the indicated time points. Data are expressed as mean ± S.E.M.

[0332] As single agents, all four anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies showed enhanced anti-tumor activity relative to anti-VEGF antibody bevacizumab. In combination with irinotecan, treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R83 resulted in the greatest inhibition of tumor growth (Figure 11).

[0333] Following the treatment phase, tumor sections were prepared and analyzed by hematoxylin and eosin (H&E) staining. The tumors treated with 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R83 in combination with irinotecan showed dark pink staining regions providing evidence of extensive calcification. This is characteristic of highly necrotic tumor tissue.

Example 12

Non-GLP toxicity study of bispecific antibodies in cynomolgus monkeys

A non-GLP toxicity study in cynomolgus monkeys was initiated to evaluate and compare the toxicity profile of some of the bispecific antibodies. The animals were dosed with 0 mg/kg (control), 5 mg/kg (low dose), or 30 mg/kg (high dose) of anti-DLL4/anti-VEGF bispecific antibody (219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R83, or 219R45-MB-21R79) every 2 weeks via IV infusion. 3 males and 3 females were dosed in each group. After 15 weeks, mean body weights were lower in animals receiving the high dose of 219R45-MB-21R79 than in animals that received the high dose of either 219R45-MB-21R18 or 219R45-MB-21R83. In addition, mean serum albumin levels were lower in animals that received 219R45-MB-21R79 than in those that received either 219R45-MB-21R18 or 219R45-MB-21R83. Although preliminary in nature, these early data suggest that 219R45-MB-21R18 and 219R45-MB-21R83 may have a superior toxicity profile compared to 219R45-MB-21R79.

[0334] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application.

[0335] All publications, patents, patent applications, internet sites, and accession numbers/database sequences including both polynucleotide and polypeptide sequences cited herein are hereby incorporated by reference herein in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent, patent application, internet site, or accession number/database sequence was specifically and individually indicated to be so incorporated by reference.

SEQUENCES

21M18 Heavy chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:1)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R79 Heavy chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:2)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R45 Heavy chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:3)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Light chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:4)
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWF
QQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPW
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

21M18 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:5)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R79 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:6)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV

VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R45 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:7)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Light chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:8)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

21M18 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:9)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

21R79 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:10)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

219R45 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:11)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVSS

Light chain variable region (SEQ ID NO:12)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

21R75, 21R79, 21R83, and 21M18 Heavy chain CDR1 (SEQ ID NO:13)
TAYYIH

Alternative 21R75, 21R79, 21R83, and 21M18 Heavy chain CDR1 (SEQ ID NO:79)
AYYIH

21R79 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:14)
YIANYNRATNYNQKFKG

21M18 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:15)
YISSYNGATNYNQKFKG

21R75, 21R79, 21R83, and 21M18 Heavy chain CDR3 (SEQ ID NO:16)
RDYDYDVGMDY

219R45 Heavy chain CDR1 (SEQ ID NO:17)
NYWMH

219R45 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:18)
DINPSNGRTSYKEKFKR

219R45 Heavy chain CDR3 (SEQ ID NO:19)
HYDDKYYPLMDY

Light chain CDR1 (SEQ ID NO:20)
RASESVDNYGISFMK

Light chain CDR2 (SEQ ID NO:21)
AASNQGS

Light chain CDR3 (SEQ ID NO:22)
QQSKEVPWTFGG

Human DLL4 with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:23)
MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
GDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL
CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCE
HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR
GPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS
IDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVG

Human DLL4 without predicted signal sequence (SEQ ID NO:24)
SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL
SCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCST
PWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELS
ECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANY
ACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCAR
NPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVC
NCPYGFVGSRCEFPVG

Human DLL4 N-Terminal Region (SEQ ID NO:25)
SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQN

Human DLL4 DSL Domain (SEQ ID NO:26)
WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG
EYC

Human VEGF-A with signal sequence (underlined)(SEQ ID NO:27)
MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVD
IFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPG
PHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

Human VEGF-A without predicted signal sequence (SEQ ID NO:28)

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGC
CNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG
KGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSC
KNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

21M18 Heavy chain nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:29)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC
TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
TCTCCTGGCAAGTAG

21R79 Heavy chain nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:30)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCACCA
GGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCCGCCTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC
TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
TCTCCTGGCAAGTAG

21R79 Heavy chain nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:31)
ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

219R45 Heavy chain nucleotide sequence (13A Version 1) (SEQ ID NO:32)
ATGAAGCATCTGTGGTTTTTCCTGTTGCTCGTGGCGGCACCCAGATGGGTGTTGTCCCAA
GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTATCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCTCCG
GGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATATAAG
GAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTACATG
GAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTATGAT
GACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCCAGC
GCGTCGACGAAAGGTCCCTCGGTATTTCCCCTCGCCCCCTGCTCGAGGTCGACATCCGAA
TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCGGTAACGGTGTCG
TGGAACTCGGGAGCGCTTACGTCCGGAGTCCACACATTTCCGGCGGTACTGCAATCCTCG
GGACTGTATTCGTTGTCGTCAGTGGTGACTGTCCCGTCCTCCAATTTCGGGACTCAGACC
TATACGTGCAACGTCGACCACAAACCCTCAAACACCAAGGTGGATAAGACAGTGGAGCGC
AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCGTGTCCGGCACCCCCTGTCGCCGGACCCTCAGTCTTT
TTGTTTCCGCCGAAGCCCAAAGATACACTCATGATCTCAAGAACGCCCGAGGTAACATGC
GTGGTGGTCGATGTAAGCCACGAGGATCCAGAAGTACAATTCAATTGGTATGTAGACGGG
GTCGAGGTCCATAACGCAAAGACGAAACCGAGGGAAGAGCAGTTCAATTCGACTTTCCGG
GTGGTGTCGGTGCTTACAGTCGTACATCAGGACTGGTTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGT
AAAGTATCGAATAAGGGCCTTCCAGCGCCGATTGAAAAGACCATCTCCAAGACCAAAGGA
CAGCCACGAGAGCCGCAAGTCTATACGCTTCCTCCCAGCCGAGAAAAGATGACTAAAAAC
CAGGTATCGCTTACGTGTCTCGTCAAGGGTTTCTACCCTTCGGACATCGCGGTGGAATGG
GAGAGCAATGGACAACCGGAAAACAACTACAAGACGACACCGCCTATGTTGAAAAGCGAT
GGATCGTTTTTCCTCTATTCGAAACTCACGGTCGATAAGTCACGGTGGCAGCAGGGGAAT
GTGTTCTCCTGTTCAGTGATGCACGAGGCGCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG
TCACTTTCCCCGGGAAAATGA

219R45 Heavy chain nucleotide sequence (13A Version 2) (SEQ ID NO:33)
ATGAAGCACCTCTGGTTCTTCCTGCTCCTCGTGGCTGCTCCTCGGTGGGTCCTCTCCCAA
GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTCTCC
TGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCT
GGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTACAAG
GAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTACATG
GAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTACGAC
GACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
GCTTCCACAAAAGGACCCTCCGTCTTTCCCCTCGCCCCCTGCTCCCGGTCCACATCCGAA
TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCTGTCACAGTGTCC
TGGAACTCCGGAGCTCTCACATCCGGAGTCCACACATTTCCTGCTGTGCTCCAATCCTCC
GGACTGTATTCCCTCTCCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAATTTCGGGACACAGACC
TATACATGCAACGTGGACCACAAACCCTCCAACACCAAAGTCGATAAGACAGTGGAGCGC
AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCTTGTCCTGCTCCCCCTGTGGCTGGACCTTCCGTCTTT
CTGTTTCCTCCTAAACCTAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGC
GTGGTCGTCGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCCAATTTAATTGGTATGTGGACGGG
GTGGAGGTCCATAACGCTAAGACCAAACCTAGGGAAGAGCAGTTCAATTCCACTTTCCGG
GTGGTGTCCGTGCTGACCGTCGTTCATCAGGACTGGCTCAACGGGAAAGAATACAAATGC
AAAGTCTCTAATAAGGGCCTCCCTGCTCCTATTGAAAAAACAATTTCCAAAACAAAAGGA
CAACCTCGGGAGCCTCAAGTCTACACACTGCCACCTTCCCGGGAAAAAATGACAAAAAAT
CAAGTCTCCCTCACATGTCTCGTCAAGGGATTCTACCCTTCCGACATTGCTGTGGAATGG
GAATCCAATGGACAACCTGAAAACAACTACAAGACAACACCTCCTATGCTCAAAAGCGAT
GGGTCCTTTTTCCTCTATTCCAAACTCACAGTCGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGGAAT
GTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG
TCCCTCTCCCCTGGAAAATGA

Light chain nucleotide sequence (SEQ ID NO:34)
ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC
ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTCGTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC
GGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC
TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG
ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGTTAG

21M18 Heavy chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:35)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCT

21R79 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B) (SEQ ID NO:36)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCA
CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCC

21R79 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:37)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

219R45 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13A version 1) (SEQ ID NO:38)
CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTA
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCT
CCGGGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATAT
AAGGAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTAC
ATGGAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTAT
GATGACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCC
AGC

219R45 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13A Version 2) (SEQ ID NO:39)
CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTC
TCCTGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCT
CCTGGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTAC
AAGGAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTAC
ATGGAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTAC
GACGACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCC
AGC

Light chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:40)
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

Human IgG1 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:41)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG2 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:42)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG3 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:43)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE
ALHNRFTQKSLSLSPGK

Human IgG4 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:44)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FLAG peptide (SEQ ID NO:45)
DYKDDDDK

Parental 21R79 Heavy chain with signal sequence underlined unmodified chain (SEQ ID NO:46)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 219R45 Heavy chain with signal sequence underlined (SEQ ID NO:47)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 21R79 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:48)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 219R45 Heavy chain without signal sequence (SEQ ID NO:49)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 21R79 Heavy chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:50)
CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATC
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCG
CCAGGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTAT
AACCAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTAC
ATGGAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTAC
GACTATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCC

Parental 219R45 Heavy chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:51)
CAGGTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTC
AGCTGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTAT
AAGGAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTAC
ATGGAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTAT
GACGATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGC
AGC

Parental 21R79 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (SEQ ID NO:52)
ATGAAACACTTGTGGTTTTTCCTCTTGCTCGTGGCAGCTCCTCGGTGGGTACTTTCACAA
GTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATCTCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCGCCA
GGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTATAAC
CAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTACATG
GAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTACGAC
TATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCCGCCAGC
ACCAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGT
TGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAA

Parental 219R45 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (SEQ ID NO:53)
ATGAAACACCTCTGGTTCTTTTTGCTCCTGGTGGCAGCTCCCCGATGGGTGCTTAGCCAG
GTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTCAGC
TGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCT
GGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTATAAG

GAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTACATG
GAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTATGAC
GATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGCAGC
GCGTCCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

Parental 21R79 and 219R45 light chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:54)
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC
GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG
ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Parental 21R79 and 219R45 light chain nucleotide sequence (SEQ ID NO:55)
ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGG
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC
GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG
ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCCCTCCGTCTTC
ATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAAAGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCCGGGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAAGC
GGCAACTCCCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTTGA

21R75 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:56)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R75 Heavy chain with predicted signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:57)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIAGYKDATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R75 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:58)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

21R75 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:59)
YIAGYKDATNYNQKFKG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:60)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (13B Version 1T) (SEQ ID NO:77)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (13B Version S1-2) (SEQ ID NO:61)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAG

21R83 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:62)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R83 Heavy chain with predicted signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:63)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISNYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R83 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:64)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

21R83 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:65)
YISNYNRATNYNQKFKG

21R83 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 1) (SEQ ID NO:66)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R83 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 1T) (SEQ ID NO:78)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC

TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version S1-2) (SEQ ID NO:67)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAG

21R75 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:68)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT

21R75 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:69)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

21R83 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:70)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

21R75 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:71)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

21R83 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 2) (SEQ ID NO:72)
ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

21R83 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:73)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 2) (SEQ ID NO:74)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

21M18 Heavy chain nucleotide sequence (version 2) (SEQ ID NO:75)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

21M18 Heavy chain variable region (version 2) (SEQ ID NO:76)

CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGTTGC
AAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCAGGA
CAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAACCAA
AAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATGGAA
TTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGATTAT
GATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Anti-DLL4 heavy chain CDR2 consensus sequence (SEQ ID NO:80):
$YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$, where X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine, or aspartic acid

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

3. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

4. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

5. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

6. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
(a) a heavy chain consisting essentially of SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:7; and
(b) a light chain consisting essentially of SEQ ID NO:8.

7. The antibody according to any one of claims 1-6, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

8. The antibody of claim 7, wherein the VEGF receptor is VEGFR-1 or VEGFR-2.

9. The antibody according to any one of claims 1-8, which modulates angiogenesis.

10. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

11. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

13. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

14. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(b) a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

15. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain consisting essentially of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, or SEQ ID NO:62; and
(b) a light chain consisting essentially of SEQ ID NO:8.

16. The antibody according to any one of claims 10-15, which inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor.

17. The antibody of claim 16, wherein the Notch receptor is selected from the group consisting of Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4.

18. The antibody according to any one of claims 10-17, which inhibits Notch signaling.

19. The antibody according to any one of claims 10-18, which is a monoclonal antibody.

20. The antibody according to any one of claims 10-19, which is a recombinant antibody.

21. The antibody according to any one of claims 1-20, which is a chimeric antibody.

22. The antibody according to any one of claims 1-21, which is a humanized antibody.

23. The antibody according to any one of claims 1-19, which is a human antibody.

24. The antibody according to any one of claims 1-23, which is a bispecific antibody.

25. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an IgG1 antibody.

26. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an IgG2 antibody.

27. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an antibody fragment comprising an antigen-binding site.

28. A bispecific antibody comprising:
a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and

b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4,
wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19);
wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

29. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14).

30. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15).

31. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59).

32. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YISNYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65).

33. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, which comprises:
(a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11;
(b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

34. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

35. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

36. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

37. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

38. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:9; and

(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

39. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:10; and

(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

40. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;
(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:58; and
(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

41. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;
(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:64; and
(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

42. The bispecific antibody according to any one of claims 28-41, which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers.

43. The bispecific antibody of claim 42, wherein the first and second CH3 domains are modified based upon electrostatic effects.

44. The bispecific antibody according to any one of claims 28-43, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine.

45. The bispecific antibody according to any one of claims 28-43, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate.

46. The bispecific antibody of claim 42, wherein the first and second CH3 domains are modified using a knobs-into-holes technique.

47. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:5, and two light chains of SEQ ID NO:8.

48. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:6, and two light chains of SEQ ID NO:8.

49. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:56, and two light chains of SEQ ID NO:8.

50. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:62, and two light chains of SEQ ID NO:8.

51. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an N-terminal fragment of human DLL4 (amino acids 1-191 of SEQ ID NO:24).

52. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25.

53. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

54. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25 and amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

55. The bispecific antibody according to any one of claims 28-46, wherein the first antigen-binding site binds human VEGF with a K_D of about 100nM or less and the second antigen-binding site binds human DLL4 with a K_D of about 100nM or less.

56. A bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

57. The bispecific antibody according to any one of claims 28-56, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

58. The bispecific antibody of claim 57, wherein the VEGF receptor is VEGFR-1 or VEGFR-2.

59. The bispecific antibody according to any one of claims 28-58, which inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor.

60. The bispecific antibody of claim 59, wherein the Notch receptor is selected from the group consisting of Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4.

61. The bispecific antibody according to any one of claims 28-60, which inhibits Notch signaling.

62. The bispecific antibody according to any one of claims 28-61, which modulates angiogenesis.

63. A polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

64. A cell comprising the antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

65. A cell producing the antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

66. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide that encodes an antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

67. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78.

68. A vector comprising the polynucleotide of claim 66 or claim 67.

69. A cell comprising the polynucleotide of claim 66 or claim 67 or the vector of claim 68.

70. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 1-62 and a pharmaceutically acceptable carrier.

71. A method of modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

72. A method of inhibiting growth of a tumor, wherein the method comprises contacting the tumor with an effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

73. A method of inhibiting growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

74. A method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

75. The method according to any one of claims 72-74, wherein the tumor is selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, ovarian tumor, pancreatic tumor, lung tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor.

76. A method of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

77. The method of claim 76, wherein the cancer is selected from the group consisting of colorectal cancer, colon cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, head and neck cancer, lymphoma and leukemia.

78. The method according to any one of claims 71-77, which further comprises administering a second therapeutic agent.

79. The method of claim 78, wherein the second therapeutic agent is a chemotherapeutic agent.

80. The method of claim 78, wherein the second therapeutic agent is a second antibody.

81. The method according to any one of claims 71 or 73-80, wherein the subject is human.

82. A method for the production of a bispecific antibody, comprising expressing at least one polynucleotide of claim 66 or claim 67 in a cell.

83. The method of claim 82, wherein the cell is a prokaryotic cell or a eukaryotic cell.

84. The method of claim 82 or claim 83, further comprising isolating the bispecific antibody from the cell or the cell culture supernatant.

85. An antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

86. The antibody of claim 85 which is a bispecific antibody and further comprises a second antigen-binding site, wherein the second antigen-binding site specifically binds human VEGF and comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19) ; and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

87. A bispecific antibody comprising (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1nM and about 1.0 nM and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM.

88. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 85-87 and a pharmaceutically acceptable carrier.

89. A method of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody according to any one of claims 85-87.

Figure 1A

Bispecific Antibody	Anti-VEGF binding region			Anti-DLL4 binding region		
	Heavy Chain			Heavy Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
219R45-MB-21M18	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R79	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R75	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R83	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)

Bispecific Antibody	Anti-VEGF and Anti-DLL4 binding regions		
	Light Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3
219R45-MB-21M18	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R79	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R75	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R83	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

Figure 1B

Bispecific Antibody	Anti-VEGF binding region		Anti-DLL4 binding region	
	Heavy Chain Variable Region	Light Chain Variable Region	Heavy Chain Variable Region	Light Chain Variable Region
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:12

Figure 1C

Bispecific Antibody	Anti-VEGF binding region		Anti-DLL4 binding region	
	Heavy Chain	Light Chain	Heavy Chain	Light Chain
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:57 SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:63 SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8

Figure 2

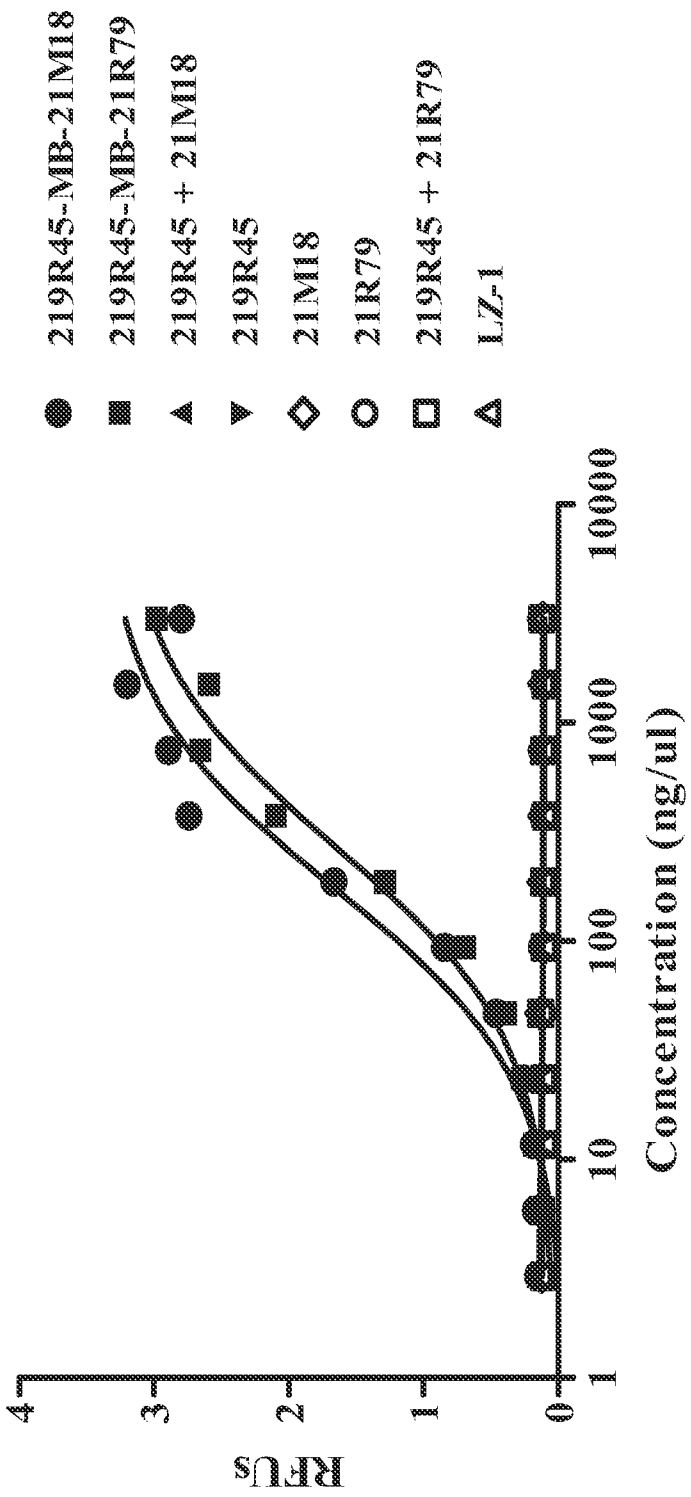

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
219R45 + 21M18
219R45
21M18
21R79
219R45 + 21R79
LZ-1
RFUs
0
1
2
3
4
1
10
100
1000
10000
Concentration (mg/ul)

Figure 3

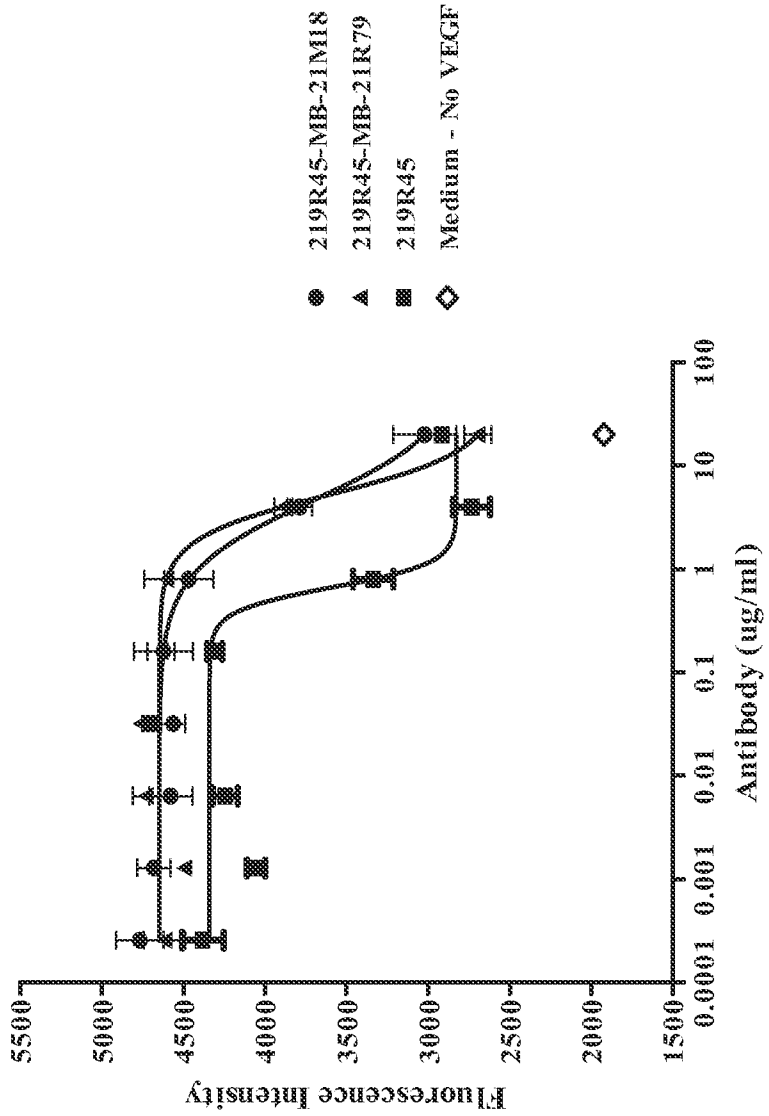

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
219R45
Medium - No VEGF
Fluorescence Intensity
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Antibody (ug/ml)

Figure 4

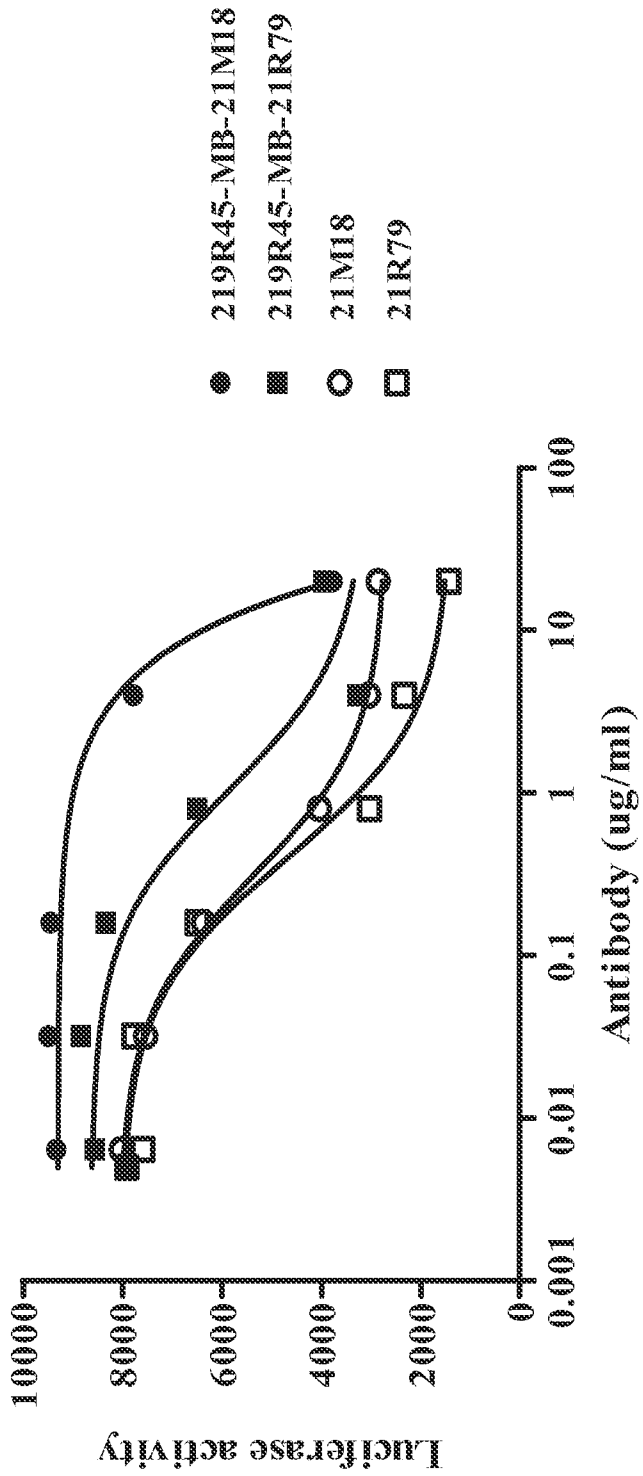

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
21M18
21R79
Luciferase activity
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.0001
0.01
0.1
1
10
100
Antibody (ug/ml)

Figure 5

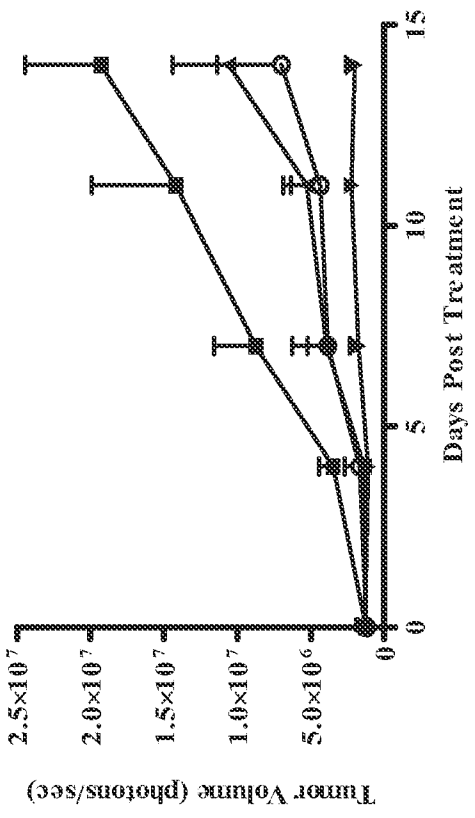

C8 – Skin graft Model
Tumor Volume (photons/sec)
2.5×10^7
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
5
10
15
Days Post Treatment
Control Ab
Anti-hDLL4 Ab - 21M18
Anti-VEGF Ab - bevacizumab
Anti-VEGF/DLL4 Bispecific - 219R45-MB-21M18

Figure 6

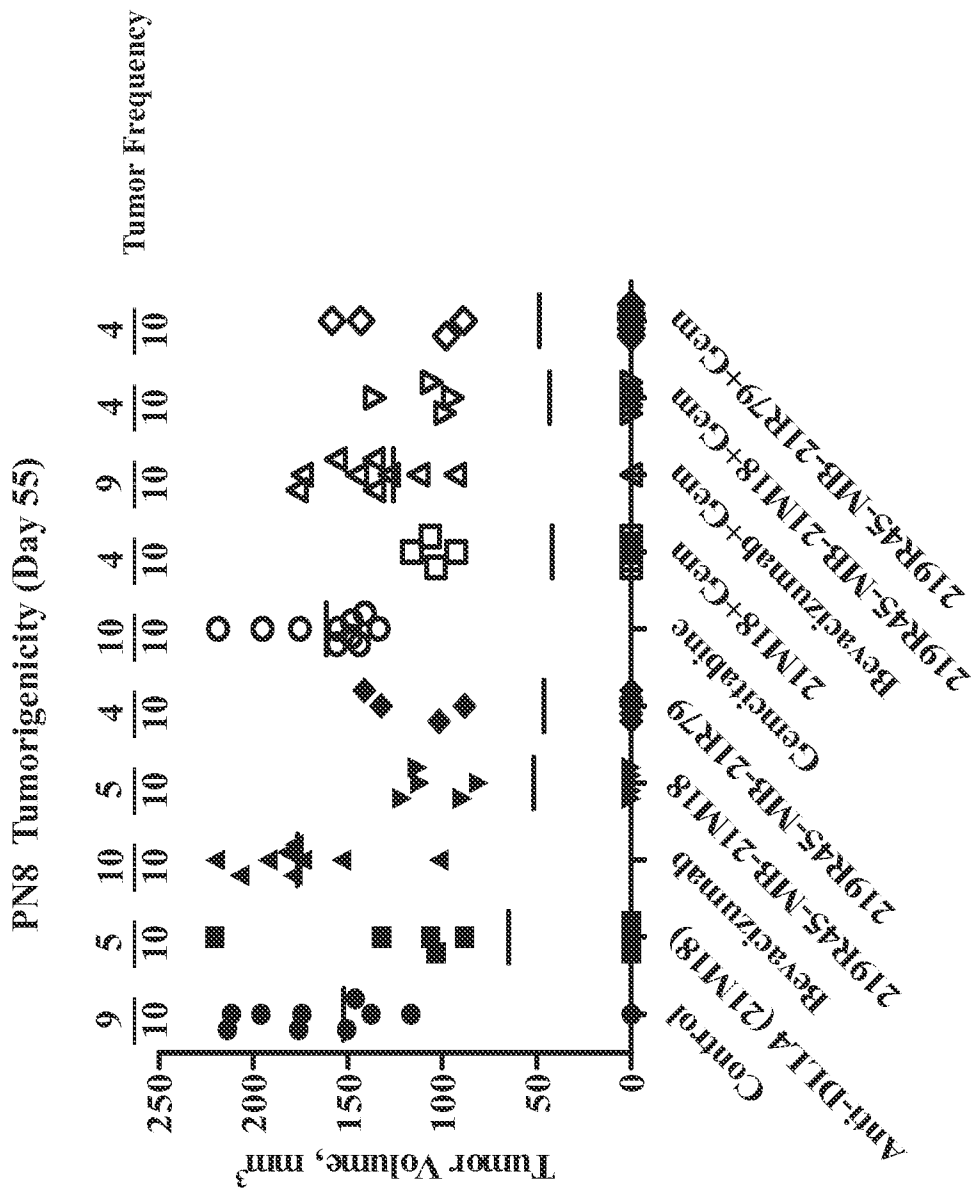

PN8 Tumorigenicity (Day 55)
Tumor Volume, mm³
250
200
150
100
50
0
Tumor Frequency
9/10
5/10
10/10
5/10
4/10
10/10
4/10
10/10
9/10
4/10
4/10
10/10
Control
Anti-DLL4 (21M18)
Bevacizumab
21gRA5-MB-21M18
21gRA5-MB-21R79
Gemcitabine
21M18+Gem
Bevacizumab+Gem
21gRA5-MB-21M18+Gem
21gRA5-MB-21R79+Gem

Figure 7

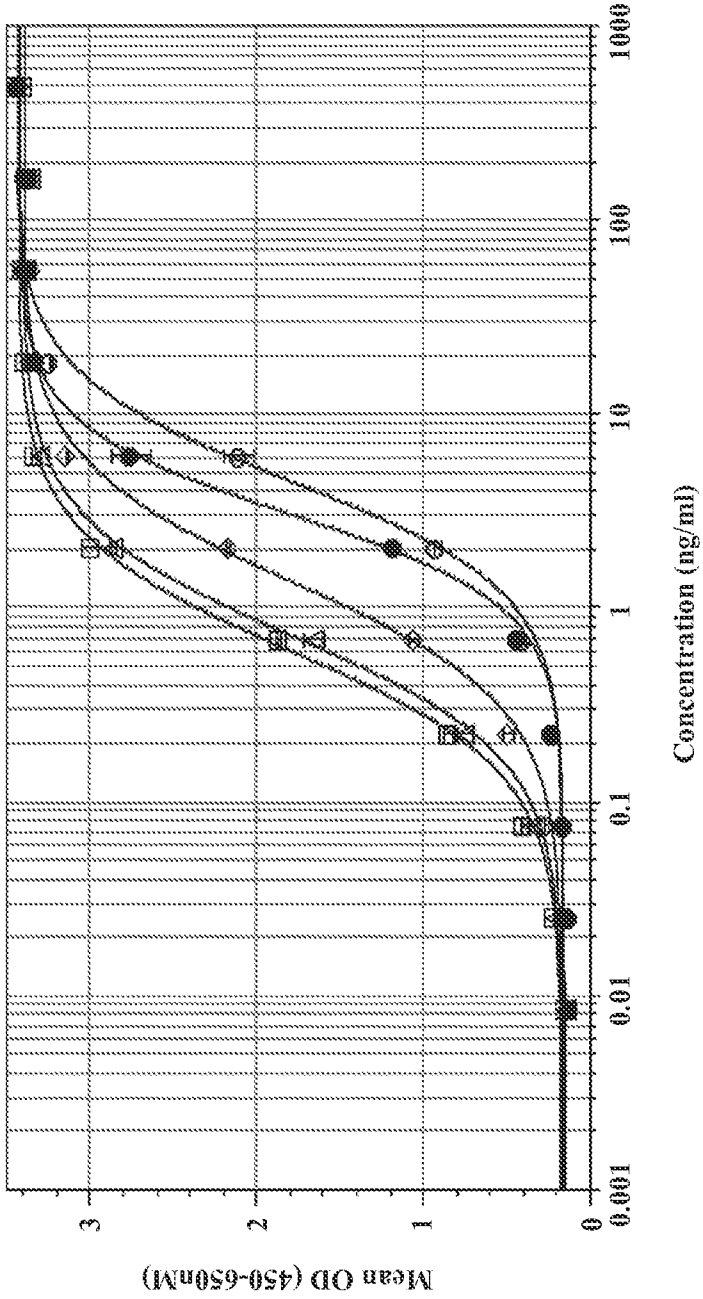

Mean OD (450-650nM)
0
1
2
3
0.0001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (ng/ml)

Figure 8

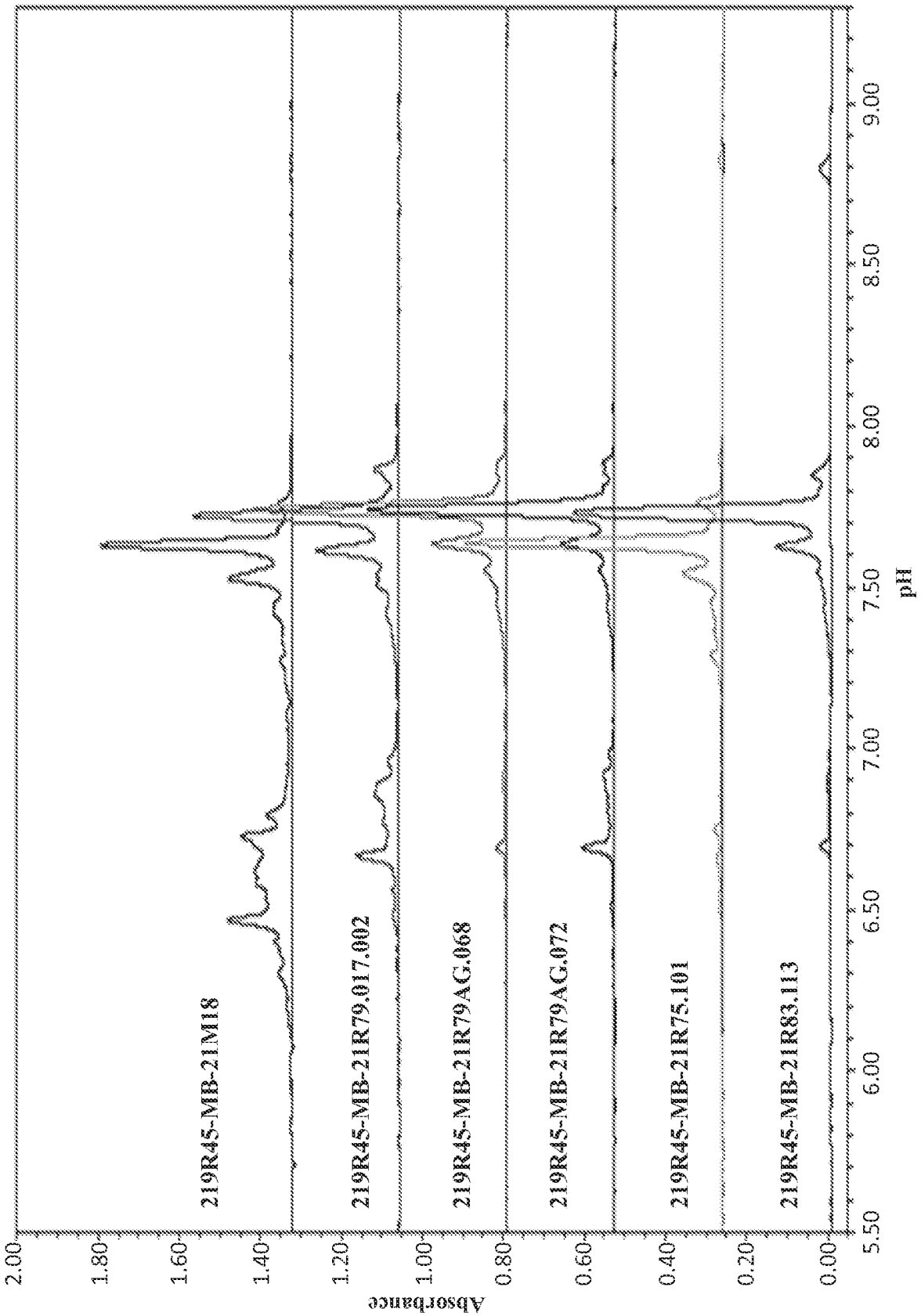

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79.017.002
219R45-MB-21R79AG.068
219R45-MB-21R79AG.072
219R45-MB-21R75.101
219R45-MB-21R83.113
Absorbance
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
pH

Figure 9

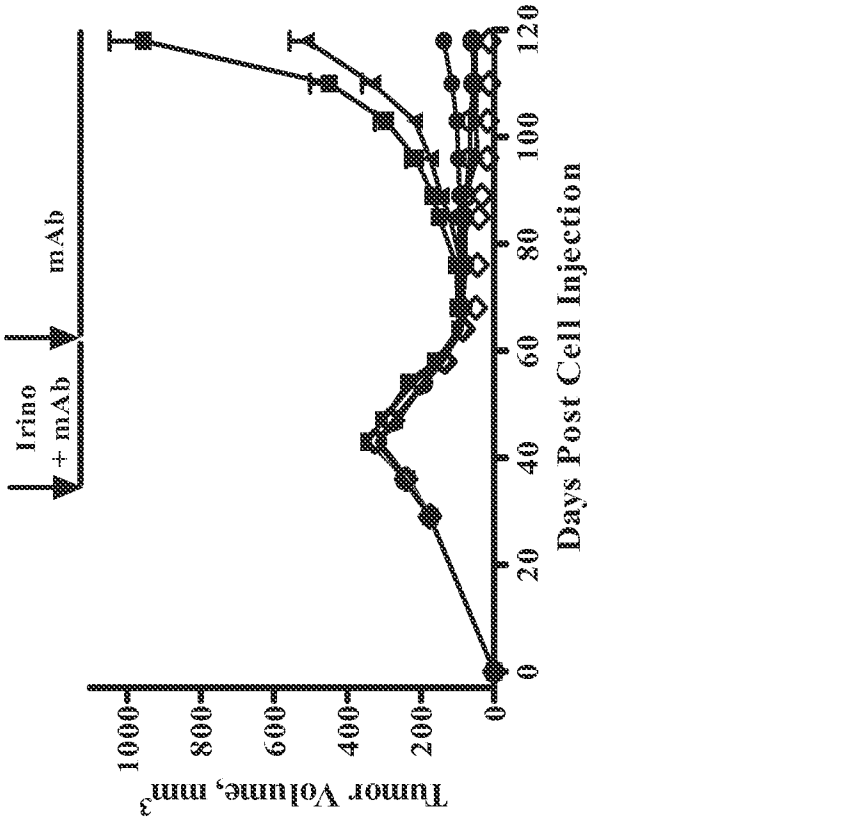

Irino + mAb
mAb
Irino -> Control mAb
Irino + bevacizumab -> bevacizumab
Irino + 21M18 -> 21M18
Irino + 21M18 + bevacizumab -> 21M18 + bevacizumab
Irino + 219R45-MB-21R79 -> 219R45-MB-21R79
Irino + 219R45-MB-21M18 -> 219R45-MB-21M18
Tumor Volume, mm3
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
Days Post Cell Injection

Figure 10

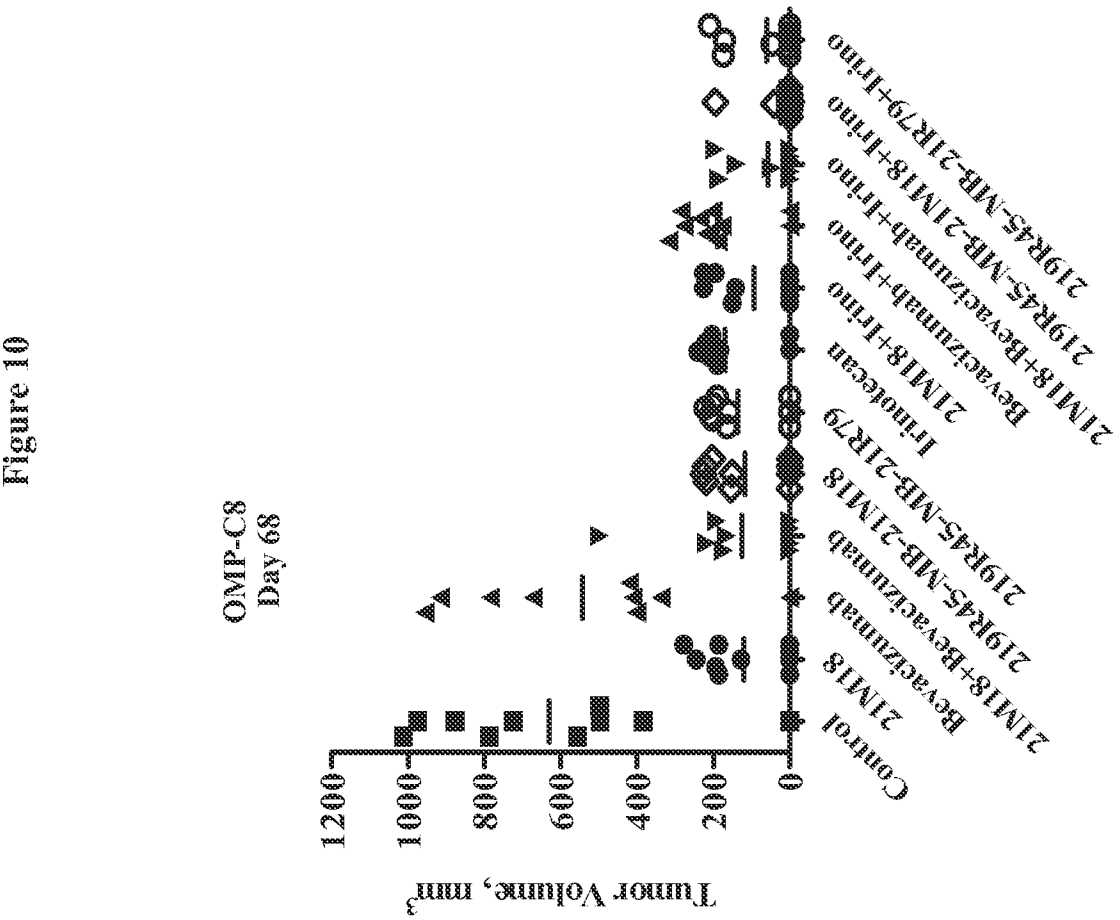
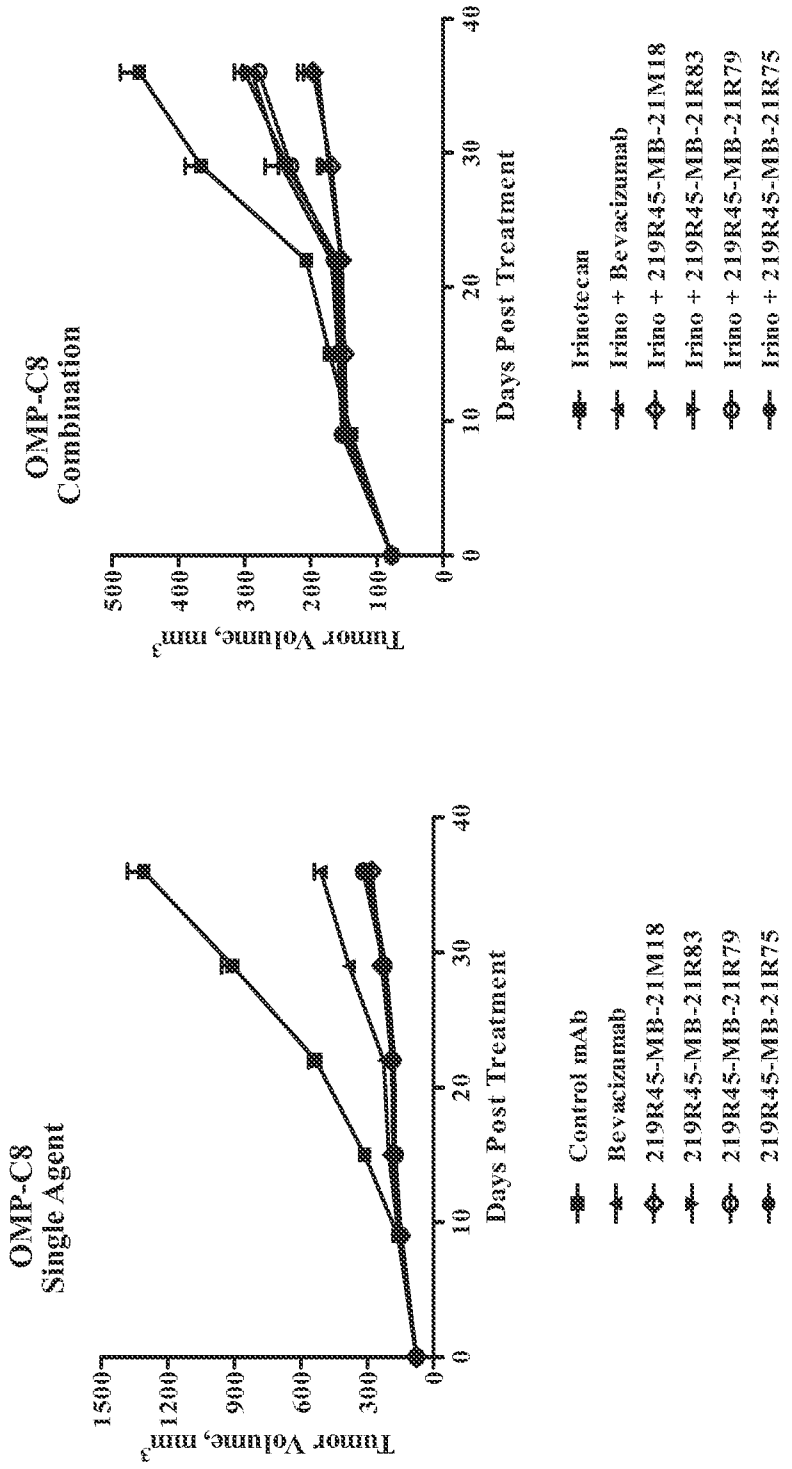

OMP-C8
Day 68
Tumor Volume, mm3
1200
1000
800
600
400
200
0
Control
21M18
Bevacizumab
21M18+Bevacizumab
21R45-MB-21M18
21R45-MB-21R79
Irinotecan
21M18+Irino
Bevacizumab+Irino
21M18+Bevacizumab+Irino
21R45-MB-21M18+Irino
21R45-MB-21R79+Irino

Figure 11


OMP-C8
Single Agent
Tumor Volume, mm3
1500
1200
900
600
300
0
0
10
20
30
40
Days Post Treatment
OMP-C8
Combination
Tumor Volume, mm3
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Days Post Treatment
Control mAb
Bevacizumab
219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R83
219R45-MB-21R79
219R45-MB-21R75
Irinotecan
Irino + Bevacizumab
Irino + 219R45-MB-21M18
Irino + 219R45-MB-21R83
Irino + 219R45-MB-21R79
Irino + 219R45-MB-21R75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/56886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 (2012.01)
USPC - 424/136.1
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)
USPC: 424/136.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 530/387.3, 530/389.2, 536/23.53, 536/23.1 (keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), PatBase, Google Patents/Scholar
Search Terms Used: VEGF antibody, NYWMH, DINPSNGRTSYKEKFKR, HYDDKYYPLMDY, RASESVDNYGISFMK, AASNQGS, QQSKEVPWTFGG

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0172398 A1 (Borges, et al.) 14 July 2011 (14.07.2011) para [0013]-[0015], [0021]-[0022], [0095]	1, 7-8
A	US 2010/0076178 A1 (Ghayur, et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) para [0012]-[0013], [0055]	1, 7-8
A	US 2010/0150940 A1 (Adam, et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) para [0047], SEQ ID NO: 1	1, 7-8
A	US 2011/0165162 A1 (Hoey, et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0021], SEQ ID NOs: 7-9	1, 7-8
A	US 2004/0265307 A1 (Singh, et al.) 30 December 2004 (30.12.2004) para [0022], SEQ ID NO: 2	1, 7-8
A	US 2004/0123343 A1 (La Rosa, et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) para [0005], SEQ ID NO: 130866	1, 7-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
07 February 2013 (07.02.2013)	28 FEB 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/56886

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.: 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84
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:

Group I+: claims 1-8, 10-17, 28-43, 46-54, 56, 63, 67, and 85-89 drawn to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 17-22 (Claims 1 and 7-8). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

- Please see extra sheet for continuation -

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 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, 7-8, restricted to SEQ ID NOs: 17-22

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/US 12/56886

Continuation of:
Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0172398 A1 to Borges et al. (hereinafter 'Borges'). Borges discloses an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4 (para [0013]-[0015] and [0095]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequences. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

AGENTES DE LIGACION AL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR/LIGANDO 4 SIMILAR A DELTA (VEGF/DLL4) Y USOS DE LOS MISMOS

Campo de la Invención

La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos y otros agentes que se ligan a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como DLL4, particularmente anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4, así como a métodos para usar los anticuerpos u otros agentes para el tratamiento de enfermedades tal como cáncer.

Antecedentes de la Invención

La angiogénesis desempeña una función importante en la patogénesis de una variedad de trastornos, incluyendo tumores sólidos y metástasis. La producción de nuevos vasos sanguíneos es esencial para proporcionar oxígeno y nutrientes para el crecimiento y propagación de un tumor, y por lo tanto la angiogénesis es un buen objetivo para los productos terapéuticos para el cáncer.

La angiogénesis incluye una familia de proteínas que actúan como activadores angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, por sus siglas en inglés), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, y sus receptores respectivos (VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3). El VEGF-A, también referido como VEGF o factor de permeabilidad vascular (VPF, por sus

siglas en inglés), existe en varias isoformas que surgen del empalme alteARNtivo de mARN de un gen VEGF individual, con el $VEGF_{165}$ que es la isoforma más biológicamente relevante.

Los anticuerpos anti-VEGF han mostrado que suprimen el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado, bevacizumab (AVASTIN) se ha desarrollado y aprobado en los Estados Unidos como un producto terapéutico para el cáncer.

La trayectoria de señalización Notch es un sistema de transducción de señal universalmente conservado. Se implica en la determinación del destino celular durante el desarrollo incluyendo la formación del patrón embriónico y el mantenimiento de tejido pos-embriónico. Además, la señalización Notch se ha identificado como un factor crítico en el mantenimiento de células madre hematopoyéticas.

La trayectoria Notch se ha relacionado con la patogénesis de tumores y cánceres tanto hematológicos como sólidos. Las numerosas funciones celulares y señales microambientales asociadas con la tumorigénesis han mostrado que se modulan por la señalización de la trayectoria Notch, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, adhesión, y angiogénesis (Leong y colaboradores, 2006, *Blood*, 107:2223-2233). Además, los receptores Notch y/o ligandos Notch han mostrado que desempeñan funciones oncogénicas potenciales en una variedad de cánceres humanos, incluyendo leucemia

mielogenosa aguda, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda de células T, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de la piel. (Leong y colaboradores, 2006, *Blood*, 107:2223-2233).

El ligando 4 similar a delta (DLL4, por sus siglas en inglés) es un componente importante de la trayectoria Notch y se ha identificado como un objetivo para la terapia para el cáncer. El DLL4 es un ligando Notch, caracterizado por un dominio N-terminal, un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) y repeticiones similares a EGF en tándem dentro del dominio extracelular. Se ha reportado que el DLL4 se induce por VEGF y que el DLL4 puede actuar como un regulador de retroalimentación negativo para la proliferación vascular.

Los anticuerpos anti-DLL4 han mostrado que mejoran la proliferación y ramificación angiogénica que conduce a la angiogénesis no productiva y crecimiento tumoral disminuido (Noguera-Troise y colaboradores, 2006, *Nature*, 444:1032-1037). Además, un anticuerpo anti-DLL4, 21M18, ha mostrado que inhibe el crecimiento tumoral y reduce la frecuencia de célula madre cancerosas en modelos de tumor de xenoinjerto (Hoey y colaboradores, 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-177; Patente de E. U. A. No. 7,750,124).

Aunque ha habido avances significativos en el desarrollo

de anticuerpos monoclonales para el uso en tratamientos del cáncer, existe a un gran potencial para mejoras adicionales. Una clase de moléculas de anticuerpo con la promesa de potencia aumentada y/o efectos secundarios reducidos (por ejemplo, toxicidad) son los anticuerpos biespecíficos.

Las moléculas biespecíficas tempranas se generaron principalmente usando reticulación química de dos anticuerpos, o fueron hibridomas o “cuadromas” híbridos. Un éxito del formato cuadroma es triomabs, que son combinaciones de ratón/rata que muestran un emparejado de cadena pesada/ligera específico d especies preferencial. Más recientemente, los avances en la ingeniería de anticuerpos han proporcionado una amplia variedad de nuevos formatos de anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, scFv en tándem (bi-scFv), diacuerpos, diacuerpos en tándem (tetra-cuerpos), diacuerpos de cadena individual, y anticuerpos de dominio variable dobles.

Es uno de los objetivos de la presente invención proporcionar moléculas mejoradas para el tratamiento del cáncer, particularmente anticuerpos biespecíficos que se liguen específicamente al VEGF humano y DLL4 humano.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona agentes de ligación, tales como anticuerpos, que se ligan a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como DLL4 (agentes de ligación a VEGF/DLL4), así como

composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden los agentes de ligación. Los agentes de ligación que se ligan a VEGF o DLL4, así como por lo menos un antígeno adicional u objetivo, y composiciones farmacéuticas de tales agentes de ligación, también se proporcionan. En ciertas modalidades, los agentes de ligación son polipéptidos novedosos, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y otros polipéptidos relacionados con tales anticuerpos. En ciertas modalidades, los agentes de ligación son anticuerpos que se ligan específicamente al VEGF humano. En algunas modalidades, los agentes de ligación son anticuerpos que se ligan específicamente al DLL4 humano. En algunas modalidades, los agentes de ligación son anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. La invención proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de un tumor al administrar los agentes de ligación a un sujeto con un tumor. La invención proporciona además métodos para tratar cáncer al administrar los agentes de ligación a un sujeto en necesidad de los mismos. En algunas modalidades, los métodos para tratar cáncer o inhibir el crecimiento tumoral comprenden células madre cancerosas objetivo con los agentes de ligación. En ciertas modalidades, los métodos comprenden reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, reducir el número de células madre cancerosas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un

tumor y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor al reducir el número o frecuencia de células madre cancerosas en el tumor.

En un aspecto, la invención proporciona un agente de ligación, tal como un anticuerpo, que se liga específicamente al VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de VEGF a VEGFR-1 y/o VEGFR-2. En algunas modalidades, el agente de ligación modula la angiogénesis. En ciertas modalidades, el anticuerpo u otro agente de ligación se ligan específicamente además a y/o inhibe el DLL4 humano además del VEGF.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesadas que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia

a SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es el anticuerpo 219R45, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, o 219R45-MB-21R83.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de ligación, tal como un anticuerpo, que se liga específicamente a DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de DLL4 a Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4. En

algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación promueve la angiogénesis no productiva. En ciertas modalidades, el anticuerpo u otro agente de ligación se ligan específicamente además a y/o inhibe el VEGF humano además del DLL4 humano.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que se liga al DLL4 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID

NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10; y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo 21R79 o anticuerpo 219R45-MB-21R79.

En algunas modalidades, el agente de ligación en un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada

que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:58; y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo 21R75 o anticuerpo 219R45-MB-21R75.

En algunas modalidades, el agente de ligación en un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas

modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:64; y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo 21R83 o anticuerpo 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos o modalidades ya mencionadas, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en cualquier lugar en la presente, el agente de ligación es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente al VEGF humano y a un segundo objetivo. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente al DLL4 humano y a un segundo objetivo. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a tanto VEGF humano como DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico modula la angiogénesis. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico modula la angiogénesis e inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico reduce el número de frecuencia de células madre cancerosas. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas. En ciertas modalidades el anticuerpo

biespecífico es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG2).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sito deligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico

comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de

cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH

(SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que

comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una

CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de

cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente DLL4 humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo

biespecífico se liga específicamente DLL4 humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, y comprende: (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95%

de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende (a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga a VEGF humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 1.0 nM y (b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga

específicamente DLL4 humano con un a K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 20 nM. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico seleccionado del grupo que consiste de 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos ya mencionados, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en cualquier lugar en la presente, el agente de ligación o anticuerpo se aísla.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En algunas modalidades, el polipéptido se aísla. En ciertas modalidades, el polipéptido es sustancialmente puro. En ciertas modalidades, el polipéptido es un anticuerpo o parte de un anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de polinucleótido aisladas que comprenden un polinucleótido que

codifica los agentes de ligación y/o polipéptidos de cada uno de los aspectos ya mencionados, así como otros aspectos y/o modalidades descritos en la presente. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, y SEQ ID NO:74. La invención proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos, así como células que comprenden los vectores de expresión y/o los polinucleótidos. En algunas modalidades, la célula es una célula procariótica o una célula eucariótica.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de esos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que

comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para modular la angiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como DLL4, incluyendo a cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto al reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4, o a tanto VEGF como DLL4,

incluyendo a cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4, o a tanto VEGF como DLL4, incluyendo a cada uno de esos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una gente de ligación (por ejemplo, anticuerpos) descritas en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable se proporcionan adicionalmente, como son líneas de células que expresan y/o producen los agentes de ligación. Los métodos para tratar cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto (por ejemplo, un humano) que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende los agentes de ligación también se proporcionan.

Donde los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención abarca no solamente la totalidad de la lista en su conjunto, sino también cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal, y también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente

invención también prevé la exclusión explicita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reclamada.

Breve Descripción De Las Figuras

Figuras 1A-1C. Fig. 1A, CDRs de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21M79, 219R45-MB-21M75, y 219R45-MB-21M83; Fig. 1B) Región variable de cadena pesada y cadena ligera SEQ ID NOs; Fig. 1C) SEQ ID Nos dé cadena pesada y cadena ligera.

Figura 2. Ensayo HTRF para ligación simultánea de anticuerpos biespecíficos al VEGF humano y DLL4 humano. Los resultados se reportan en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU, por sus siglas en inglés), que representa la relación de la intensidad de fluorescencia relativa a 665nm a la intensidad de fluorescencia relativa a 620nm. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 219R45 más 21M18 (-▲-); 219R45 más 21R79 (-□-); 219R45 (-▼-); 21M18 (-◊-); 21R79 (-○-); anticuerpo de control LZ-1 (-Δ-).

Figura 3. Inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF por los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. La intensidad de fluorescencia se lee usando una longitud de onda de excitación de 530nm y una longitud de emisión de 590. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-▲-); 219R45 (-■-); Medio sin VEGF (-◊-).

Figura 4. Inhibición de la señalización Notch inducida por DLL4 por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. La actividad de luciferasa se midió usando un kit de ensayo de luciferasa doble con actividad de luciferasa de Luciérnaga normalizada con la actividad de luciferasa de Renilla. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 21M18 (-o-); 21R79 (-□-).

Figura 5. Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* por un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en un injerto de piel humana en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (-▲-), anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (-o-), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-▼-). Los datos se muestran como volumen de tumor (fotones/sec) durante los días pos-tratamiento. Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 25mg/kg una vez a la semana.

Figura 6. Tumorigenicidad de células tumorales pancreáticas después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales OMP-PN8 de ratones tratados con anticuerpo de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18

o 219R45-MB-21R79 con o sin gemcitabina se procesaron a suspensiones de células individuales, y se trasplantaron en serie en ratones. 90 células de cada grupo de tratamiento se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los tumores se dejaron desarrollar sin ningún tratamiento. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) en el día 55. La frecuencia del tumor se muestra como un número de tumores sobre el número total de ratones inyectados en cada grupo.

Figura 7. ELISA de anticuerpo biespecífico. Anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo (1x de PBS, 0.1% de gelatina, 0.1% de Polisorbato-20, pH 7.4) que contiene 2µg/ml de biotina-DLL4-hFc. Los anticuerpos se diluyeron en serie 3 veces de 500ng/ml a 0.008ng/ml. Las muestras de anticuerpos se incubaron durante 2 horas en solución amortiguadora de bloqueo que contiene la biotina-DLL4-hFc. Después de la incubación, las muestras de anticuerpos se transfirieron a una placa de ensayo recubierta con VEGF (100 ul/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Se agregó Estreptavidina-HRP a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. El sustrato TMB se agregó a los pocillos con un desarrollo de color de 10 minutos y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se leyó a 450-650nm y los datos se analizaron usando el ajuste de 4 parámetros dentro del programa de

análisis Softmax Pro.

Figura 8. Enfoque isoeléctrico capilar formado en imagen de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4.

Figura 9. Inhibición del crecimiento del tumor del colon por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 en un modelo de recurrencia de tumor. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (-●-), anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (-▲-), una combinación de 21M18 y bevacizumab (-▼-), anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-◊-), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 (-o-), todos en combinación con irinotecano. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se administraron intraperitonealmente en una dosis de 7.5mg/kg una vez a la semana, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se administraron intraperitonealmente en una dosis de 15mg/kg una vez a la semana, y el irinotecano se administró para las primeras 4 semanas en una dosis de 45mg/kg. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) durante los días pos-tratamiento.

Figura 10. La tumorigenicidad de células tumorales de colon OMP-C3 después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Los tumores de ratones tratados con anticuerpo de control, anticuerpo anti-hDLL4

21M18, anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab, una combinación de 21M18 y de bevacizumab, o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 con o sin irinotecano se procesaron a suspensiones de células individuales, y se trasplantaron en serie en ratones. 150 células de cada grupo de tratamientos se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los tumores se dejaron desarrollar sin ningún tratamiento. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) en el día 68.

Figuras 11A-11B. Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab (-▲-), o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-◊-), 219R45-MB-21R75 (-●-), 219R45-MB-21R79 (-o-), o 219R45-MB-21R83 (-▼-). Los ratones se trataron con anticuerpos como agentes individuales (Fig. 11A) o en combinación con irinotecano (Fig. 11B). Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 15mg/kg una vez a la semana e irinotecano en una dosis de 7.5mg/kg una a la semana. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) durante los días pos-tratamiento.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona agentes de ligación

novedosos, que incluyen pero no se limitan a polipéptidos tales como anticuerpos, que se ligan a VEGF y/o DLL4 (por ejemplo, un agente de ligación VEGF/DLL4). Los polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4, y métodos para elaborar los agentes de ligación VEGF/DLL4 también se proporcionan. Métodos para usar los agentes de ligación VEGF/DLL4 novedosos, tales como métodos para inhibir el crecimiento tumoral, métodos para tratar el cáncer, métodos para reducir la tumorigenicidad de un tumor, métodos para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor y/o métodos para modular la angiogénesis, se proporcionan adicionalmente.

Un anticuerpo monoclonal que se liga específicamente al VEGF humanos se ha identificado, 219R45. Ese anticuerpo tiene una afinidad de ligación para el VEGF humano de aproximadamente 0.67nM, y una afinidad de ligación para VEGF de ratón de aproximadamente 23nM. Varios anticuerpos monoclonales que se ligan específicamente al DLL4 humano se han identificado, 21R79, 21R75 y 21R83. El anticuerpo 21R79 tiene una afinidad de ligación para el DLL4 humano de menor que 0.1nM. Los anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente al VEGF humano y al DLL4 humano se han producido, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 (secuencias CDR en las Figuras 1A-1C). Como

se usa en la presente, el “MB” dentro de un nombre de anticuerpo se refiere a “monovalente/biespecífico”. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tiene una afinidad de ligación para el VEGF humano de menor que 1.0nM y una afinidad de ligación para el DLL4 de aproximadamente 16nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tiene una afinidad de ligación al VEGF de menor que 1.0nM y una afinidad de ligación para el DLL4 humano de menor que 1.0nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75 tiene una afinidad de ligación para el DLL4 humano de aproximadamente 5nM, mientras que el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83 tiene una afinidad de ligación para el DLL4 humano de aproximadamente 1nM. Los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se ligan al VEGF de ratón (Ejemplo 1, Tabla 3). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se ligan al VEGF humano y DLL4 simultáneamente (Ejemplo 2, Figura 2). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC (Ejemplo 3, Figura 3). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la señalización Notch inducida por DLL4 (Ejemplo 4, Figura 4). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben el crecimiento tumoral (Ejemplos 5, 9, 11 y Figuras 5, 9, 11A-11B). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la tumorigenicidad (Ejemplos 6 y 10 y Figuras 6, 10). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se

ligan tanto a VEGF como DLL4 en un ELISA biespecífico (Ejemplo 7, Figura 7). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se aíslan y purifican a un producto que comprende por lo menos 90% de anticuerpo heterodimérico (Ejemplo 8, Tabla 7).

I. Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la presente invención, una variedad de términos y frases se definen a continuación.

El término “anticuerpo” como se usa en la presente se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se liga específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores, a través de por lo menos un sitio de reconocimiento a antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos de cadena individual, fragmento de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')2, y fragmentos Fv), anticuerpos Fv de cadena individual (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un sitio de ligación a antígeno de un anticuerpo,

y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno (es decir, sitio de ligación a antígeno) siempre y cuando los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2), basado en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidad diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser desnudos o conjugados a otras moléculas, incluyendo pero no limitado a, toxinas y radioisótopos.

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables de determinación antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')2, y fragmentos de Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena individual, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. “Fragmento de anticuerpo” como se usa en la presente comprende un sitio de ligación a antígeno o sitio de ligación a epítopo.

El término “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de una cadena ligera de anticuerpo o la región variable de una cadena pesada de anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras consisten cada una de cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) conectadas por tres regiones de determinación de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés), también conocidas como “regiones hipervariables”. Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por regiones de estructura y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de ligación a antígeno del anticuerpo. Existen por lo menos dos técnicas para determinar las CDRs: (1) un procedimiento basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y colaboradores, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición*, National Institutes of Health, Bethesda, MD), y (2) un procedimiento basado en estudios cristalográficos de complejos de antígenos-anticuerpo (Al-Lazikani y colaboradores, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). Además, las combinaciones de estos dos procedimientos se usan algunas veces en la técnica para determinar la CDRs.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente se refiere a una población de anticuerpos homogéneos implicados en el reconocimiento y ligación sumamente

específica de un determinante o epítopo antigénico individual. Esto es en contraste con los anticuerpos monoclonales que incluyen típicamente una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos contra una variedad de determinantes antigénicos diferentes. El término “anticuerpo monoclonal” abarca tanto anticuerpos monoclonales intactos como de longitud completa así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos de cadena individual (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno (sitio de ligación a antígeno). Adicionalmente, el “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos fabricados por cualquier número de técnicas incluyendo pero no limitado a, producción de hibridoma, selección en fago, expresión recombinante, y animales transgénicos.

El término “anticuerpo humanizado” como se usa en la presente se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las CDRs se reemplazan por residuos de la CDRs de una especie no humana (por

ejemplo, ratón, rata, conejo, o hámster) que tienen la especificidad deseada, afinidad y/o capacidad de ligación (Jones y colaboradores, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann y colaboradores, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen y colaboradores, 1988, *Science*, 239:1534-1536). En algunos casos, los residuos de región de estructura Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tienen la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación. El anticuerpo humanizado se puede modificar además por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar u optimizar la especificidad de anticuerpos, afinidad, y/o capacidad de ligación. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen, todo o sustancialmente todo de la CDRs que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas de las regiones de estructura son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos usados para

generar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, Patente de E.U.A. 5,225,539.

El término “anticuerpo humano” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano. Un anticuerpo humano se puede fabricar usando cualquiera de las técnicas conocidas en el campo. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende CDRs no humanas.

El término “anticuerpo quimérico” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación, mientras que las regiones constantes corresponden a las secuencias en los anticuerpos derivados de otras especies (usualmente humano).

La frase “anticuerpo madurado por afinidad” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo que da por resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, comparado con un anticuerpo precursor que no posee esas

alteraciones. La definición también incluye alteraciones en los residuos no de CDR hechos en conjunción con las alteraciones a los residuos CDR. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares a un picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por los procedimientos conocidos en el campo. Por ejemplo, Marks y colaboradores, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, describe maduración por afinidad mediante transposición de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o los residuos de estructura se describe por Barbas y colaboradores, 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier y colaboradores, 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton y colaboradores, 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson y colaboradores, 1995, *J. Immunol.*, 154:3310-9; y Hawkins y colaboradores, 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede usar para obtener anticuerpos madurados por afinidad.

Los términos “epítopo” y “determinante antigénico” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocida y liga específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos se pueden formar tanto de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados de aminoácidos contiguos (también referidos

como epítopos lineales) se retienen típicamente en la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario (también referidos como epítopos conformacionales) se pierden típicamente en la desnaturalización de la proteína. Un epítopo incluye típicamente por lo menos 3, y más usualmente, por lo menos 5 o 8–10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los términos “molécula heteromultimérica” o “heteromultímero” o “complejo heteromultimérico” o “polipéptido heteromultimérico” se usan intercambiablemente en la presente para referirse a una molécula que comprende por lo menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido por al menos un residuo de aminoácido. La molécula heteromultimérica puede comprender un “heterodímero” formado por el primero y segundo polipéptido o puede formar estructuras terciarias de orden superior donde están presentes los polipéptidos adicionales.

Los términos “antagonista” y “antagonístico” como se usa en la presente se refieren a cualquier molécula que bloquea parcial o completamente, inhibe, reduce, neutraliza una actividad biológica de un objetivo y/o rutas de señalización (por ejemplo, la trayectoria Notch). El término “antagonista” se usa en la presente para incluir cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba, reduzca o neutralice

la actividad de una proteína. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente, pero no se limitan a, anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpo.

Los términos “modulación” y “modulan” como se usa en la presente se refiere a un cambio o una alteración en una actividad biológica. La modulación incluye, pero no se limita a, estimular o inhibir una actividad. La modulación puede ser un incremento o una disminución en la actividad (por ejemplo, una disminución en la angiogénesis o un incremento en la angiogénesis), un cambio en las características de ligación, o cualquier otro cambio en las propiedades biológicas, funcionales inmunológicas asociadas con la actividad de una proteína, ruta, u otro punto biológico de interés.

Los términos “se liga selectivamente” o “se liga específicamente” significa que un agente de ligación o un anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de lo anterior al epítopo, proteína, o molécula objetivo que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. En ciertas modalidades, “se liga específicamente” significa, por ejemplo, que un anticuerpo se liga a una proteína con una K_D por lo menos aproximadamente de 0.1mM o menos, pero más usualmente menor que aproximadamente 1μM. En ciertas modalidades, “se liga específicamente” significa que un anticuerpo se liga a un objetivo a veces con

una K_D de por lo menos aproximadamente de 0.1µM o menos, en otras veces por lo menos aproximadamente 0.01µM o menos, y en otras veces por lo menos aproximadamente 1nM o menos. Debido a que la identidad de secuencia entre las proteínas homologas en diferentes especies, la ligación específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína en más de una especie (por ejemplo, VEGF humano y VEGF de ratón). Del mismo modo, debido a la homología dentro de ciertas regiones de las secuencias de polipéptidos de diferentes proteínas, la ligación específica puede incluir un anticuerpo (u otro polipéptido o agente de ligación) que reconoce más de una proteína (por ejemplo, VEGF-A humana y VEGF-B humana). Se entiende que, en ciertas modalidades, un anticuerpo o porción de ligación que liga específicamente un primer objetivo puede o no ligarse específicamente a un segundo objetivo. Como tal "ligación específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) ligación exclusiva, ligación a un objetivo individual. De esta manera, un anticuerpo puede, en ciertas modalidades, ligarse específicamente a más de un objetivo. En ciertas modalidades, múltiples objetivos se pueden ligar por el mismo sitio de ligación a antígeno en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede, en ciertos casos, comprender dos sitios de ligación a antígenos idénticos, cada uno de los cuales se liga específicamente al mismo epítopo en dos o más proteínas. En ciertas modalidades alternativas, un anticuerpo

puede ser multiespecífico y comprende por lo menos dos sitios de ligación a antígeno con especificidades diferentes. A manera de ejemplo no limitante, un anticuerpo biespecífico puede comprender un sitio de ligación a antígeno que reconoce un epítopo en una proteína (por ejemplo, VEGF humanos) y comprende además un segundo sitio de ligación a antígeno diferente que reconoce un epítopo diferente en una segunda proteína (por ejemplo, DLL4 humano). Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la ligación significa ligación específica.

Los términos “polipéptido” y “péptido” y “proteínas” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y se puede interrumpir por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de ligación a disulfuro, glicosilación, lapidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende, que debido a que los polipéptidos de

esta invención se pueden basar en anticuerpos, en ciertas modalidades, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas individuales o cadenas asociadas.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa.

“Condiciones de alta severidad” se pueden identificar por aquellos que: (1) emplean resistencia iónica baja y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 15mM/citrato de sodio 1.5mM/0.1% de dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplear durante la hibridación en un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0.1% de albumina de suero bovino/ 0.1% de Ficol/0.1% de polivinilpirrolidona/solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM pH 6.5 en 5x SSC (NaCl 0.75M, citrato de sodio 75mM) a 42°C; o (3) emplear durante la hibridación 50% de formamida en 5x SSC, fosfato de sodio 50mM (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, 5x de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón pasado por ondas sonoras (50µg/ml), 0.1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C a 0.2x de SSC y 50% formamida, seguido por un lavado de

alta severidad que consiste de 0.1x de SSC que contiene EDTA a 55°C.

Los términos “idéntico” o porcentaje “de identidad” en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácido que son los mismos, cuando se comparan y se alinean (espacios de introducción, si es necesario) para correspondencia máxima, no considerando ninguna sustitución de aminoácido conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir usando software o algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual. Varios algoritmos y software que se pueden usar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácido o nucleótidos son bien conocidos en el campo. Estos incluyen, pero no se limitan a, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, y variaciones de los mismos. En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención son sustancialmente idénticos, significan que tienen por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, y en algunas modalidades por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de residuos de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, como es debido usando un algoritmo de comparación de secuencia o por inspección

visual. En algunas modalidades, la identidad existe sobre una región de las secuencias que es por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40-60 residuos, por lo menos aproximadamente 60-80 residuos en longitud o cualquier valor integral entre los mismos. En algunas modalidades, la identidad existe sobre una región más larga que 60-80 residuos, tal como por lo menos aproximadamente 80-100 residuos, en algunas modalidades las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, tal como la región de codificación de una secuencia de nucleótidos.

Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en la cual un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuo de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en el campo, incluyendo cadenas laterales básicas, (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo,

tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. De manea preferible, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la invención no anulan la ligación del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno al cual el polipéptido o anticuerpos se liga. Los métodos para identificar las sustituciones conservadoras de nucleótidos o aminoácidos que no eliminan la ligación al antígeno son bien conocidos en el campo.

El término “vector” como se usa en la presente significa un constructo, que es capaz de suministrar, y usualmente expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula hospedera. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmido, cósmido, o vectores fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que se “aísla” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Polipéptidos aislados, polipéptidos, polinucleótidos,

vectores, células, o composiciones incluyen aquellas que se han purificado a un grado que ya no están en una forma en la cual se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que se aísla es sustancialmente pura.

El término “sustancialmente puro” como se usa en la presente se refiere a un material que es por lo menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), por lo menos 90% puro, por lo menos 95% puro, por lo menos 98% puro, o por lo menos 99% puro.

Los términos “cáncer” y “canceroso” como se usa en la presente se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos en los cuales una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma, sarcoma, y canceres hematológicos tales como linfoma y leucemia.

Los términos “tumor” y “neoplasma” como se usa en la presente se refiere a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento celular excesivo o proliferación, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones pre-cancerosas.

Los términos “metástasis” como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual un cáncer se propaga o transfiere desde el sitio de origen hasta otras regiones del

cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en una nueva ubicación. Una célula “metastásica” o “metastasizante” es una que pierde los contactos adhesivos con células vecina y migra a través del torrente sanguíneo por nudos linfáticos desde el sitio primario de la enfermedad para invadir las estructuras corporales vecinas.

Los términos “célula madre cancerosa” y “CSC” y “célula madre tumoral” y “célula iniciadora de tumor” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a células de un cáncer o tumor que: (1) tienen capacidad proliferativa extensiva; (2) son capaces de división células asimétrica para generar uno o más tipos de progenie de células diferenciadas en donde las células diferenciadas tienen potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones de células simétricas para auto renovación o auto mantenimiento. Estas propiedades confieren para las células madre cancerosas la capacidad de formar o establecer un tumor o cáncer en trasplante en serie en un hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, un ratón) comparada con la mayoría de células tumorales que no logran formar tumores. Las células madre cancerosas se someten al auto renovación versus diferenciación en una manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar a través del tiempo conforme se presentan las mutaciones.

Los términos “célula cancerosa” y “célula tumoral” se refiere a la población total de células derivadas de un cáncer o tumor o lesión pre-cancerosa, incluyendo ambas células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células cancerosas, y células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Como se usa en la presente, los términos “célula cancerosa” o “célula tumoral” se modificarán por el término “no tumorigénicos” cuando se refiere solamente a esas células que carecen de la capacidad de renovación y diferenciarse para distinguir esas células tumorales de las células madre cancerosas.

El término “tumorigénico” como se usa en la presente se refiere a las características funcionales de una célula madre cancerosa incluyendo las propiedades de auto renovación (que da origen a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar otras células tumorales (que da origen a células tumorales diferenciadas y de esta manera no tumorigénicas).

El término “tumorigenicidad” como se usa en la presente se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células del tumor para formar tumores palpables en el trasplante en serie en los hospederos inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones). Esta definición también incluye poblaciones enriquecidas y/o aisladas de células madre cancerosas que forman tumores palpables en el trasplante en serie en

hospederos inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones).

El término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores, y similares, que van a ser el recipiente de un tratamiento particular. Típicamente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan intercambiablemente en la presente en referencia a un sujeto humano.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un producto o compuesto aprobado (o aprobable) por una agencia reguladora del gobierno Federal o gobierno estatal o listado en la Farmacopea de E.U.A u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, incluyendo humanos.

Los términos “excipiente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable” o “portador farmacéutico aceptable” se refiere a un excipiente, portador o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con por lo menos un agente de ligación (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente descripción, y que no destruye la actividad del agente de ligación. El excipiente, portador o adyuvante no deben ser tóxicos cuando se administran con un agente de ligación en dosis suficientes para administrar un efecto terapéutico.

Los términos “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” o “efecto terapéutico” se refieren

a una cantidad de un agente de ligación, un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco efectivo para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) tiene un efecto terapéutico y como tal puede reducir el número de células cancerosas; disminuir la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica; reduce el número de frecuencia de células madre cancerosas; reduce el tamaño del tumor; reduce la población de células cancerosas; inhibe y/o detiene la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación de cáncer en el tejido blando y huesos; inhibe y/o detiene la metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibe y/o detiene el crecimiento de células tumorales o cancerosas; alivia a un grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reduce la morbidez y mortalidad; mejora la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. En la medida en que el agente, por ejemplo un anticuerpo, prevenga el crecimiento y/o extermine células cancerosas existentes, se puede referir como citostático y/o citotóxico.

Los términos “que trata” o “tratamiento” o “trata” o “que alivia” o “alivia” se refiere a tanto 1) mediciones terapéuticas que curan, desaceleran, reducen los síntomas de

y/o detienen la progresión de una condición o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previene o desaceleran el desarrollo de una condición o trastorno patológico objetivo. De esta manera aquellas personas sin necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos a quienes el trastorno se va a prevenir. En algunas modalidades, un sujeto es exitosamente "tratado" de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o una ausencia de infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos incluyendo la propagación de células cancerosas en el tejido blando y huesos; inhibición de o una ausencia de metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibición o una ausencia del crecimiento canceroso; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbidez y mortalidad reducidas; mejora en la calidad de vida; reducción en la tumorigenicidad; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas; o alguna combinación de los efectos.

Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen formas plurales a menos que el contexto lo

indique claramente de otra manera.

Se entiende que donde las modalidades se describan en la presente con el lenguaje “que comprende” de otra manera las modalidades análogas descritas en los términos de “que consiste de” y/ “que consiste esencialmente de” también se proporcionan. También se entiende que donde las modalidades se describan en la presente con el lenguaje “que consiste esencialmente de” de otra manera las modalidades análogas descritas en los términos de “que consiste de” también se proporcionan.

El término “y/o” como se usa en la frase tal como “A y/o B” en la presente se propone incluir tanto A y B; A o B; A (sola); y B (sola). Del mismo modo el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B, y/o C” se propone para abarcar cada una de las siguientes modalidades: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (sola); B (sola); y C (sola).

II. Anticuerpos

La presente invención proporciona agentes que se ligan específicamente a las proteínas VEGF humanas y/o proteínas DLL4 humano. Estos agentes se refieren en la presente como “agentes de ligación a VEGF/DLL4”. La frase “agente de ligación a VEGF/DLL4” abarca a agentes que se ligan solamente de VEGF, agentes que se ligan solamente de DLL4, y agentes biespecíficos que se ligan tanto a VEGF como DLL4. En ciertas

modalidades, además de ligarse específicamente a VEGF y/o DLL4, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 se ligan específicamente además a por lo menos un objetivo o antígeno adicional. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un polipéptido. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga específicamente a VEGF humano. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga específicamente a DLL4 humano. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un biespecífico. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. Las secuencias de aminoácidos (aa) de longitud completa para el VEGF humano (VEGF-A) y DLL4 humano son conocidas en la técnica y se proporciona en la presente como SEQ ID NO:27 (VEGF) y SEQ ID NO:23 (DLL4).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1µM o menor, aproximadamente 100nM o menor, aproximadamente 40nM o menor, aproximadamente 20nM o menor, aproximadamente 10nM o menor, aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se ligan a VEGF y/o DLL4 con una K_D de

aproximadamente 20nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a tanto VEGF humano como VEGF de ratón con una K_D de aproximadamente 100nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga tanto a VEGF humano como VEGF de ratón con una K_D de aproximadamente 50nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a tanto DLL4 humano como DLL4 de ratón con una K_D de aproximadamente 100nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga tanto a DLL4 humano como a DLL4 de ratón con una K_D de aproximadamente 50nM o menor. En algunas modalidades, la constante de disociación del agente de ligación (por ejemplo, un anticuerpo) a VEGF es la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión VEGF que comprende por lo menos una porción del VEGF inmovilizado sobre un chip Biacore. En algunas modalidades, la constante de disociación del agente de ligación (por ejemplo, un anticuerpo) a DLL4 es

la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión DLL4 que comprende por lo menos una porción de DLL4 inmovilizado sobre un chip Biacore.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D de aproximadamente 100nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D de aproximadamente 20nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D of aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, la afinidad de uno de los sitios de ligación del antígeno puede ser más débil que la afinidad del otro sitio de ligación a antígeno. Por ejemplo, la K_D de un sitio de ligación a antígeno puede ser de aproximadamente 1nM y la K_D del segundo sitio de ligación a antígeno puede ser de

aproximadamente 10nM. En algunas modalidades, la diferencia en la afinidad entre los dos sitios de ligación a antígeno puede ser de aproximadamente 2 veces o más, de aproximadamente 3 veces o más, de aproximadamente 5 veces o más, de aproximadamente 8 veces o más, de aproximadamente 10 veces o más, de aproximadamente 15 veces o más, de aproximadamente 20 veces o más, de aproximadamente 30 veces o más, de aproximadamente 50 veces o más, o de aproximadamente 100 veces o más. La modulación de las afinidades de los sitios de ligación a antígeno puede afectar la actividad biológica del anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, la disminución de la afinidad del sitio de ligación a antígeno para DLL4 o VEGF, puede tener un efecto deseable, por ejemplo toxicidad disminuida del agente de ligación o índice terapéutico incrementado.

A manera de ejemplo no limitante, el anticuerpo biespecífico puede comprender (a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga a VEGF humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 1.0 nM, (b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 20 nM, entre aproximadamente 0.5nM y aproximadamente 20nM, entre aproximadamente 1.0 nM y 10nM. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga a VEGF y/o DLL4 con una concentración efectiva máxima media (EC_{50}) de aproximadamente 1µM o menor, de aproximadamente 100nM o menor, de aproximadamente 40nM o menor, de aproximadamente 20nM o menor, de aproximadamente 10nM o menor, de aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de ligación a antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es monovalente, monoespecífico, bivalente, o multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se conjuga a una porción citotóxica. En algunas modalidades, el anticuerpo se aísla.

En algunas modalidades, el anticuerpo es sustancialmente puro.

Los agentes de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpos) de la presente invención se pueden someter a ensayo par ligación específica por cualquier método conocido en el campo. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como análisis Biacore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis Western blot, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo de “emparedado”, ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, y ensayo de fijación de complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente, ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogéneo (HTRF, por sus siglas en inglés), e inmunoensayo de proteína A. Tales ensayos son de rutina y bien conocidos en el campo (véase, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, Editors, 1994–present, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

Por ejemplo, la ligación específica de un anticuerpo a VEGF humano y/o DLL4 humano se puede determinar usando el ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtítulo de 96 pocillos con antígeno, agregar el anticuerpo u otro agente de

ligación conjugado a un compuesto detectable tal como un substrato enzimático (por ejemplo peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un período de tiempo, y detectar la presencia del agente de ligación ligado al antígeno. En algunas modalidades el agente de ligación o anticuerpo no se conjuga a un compuesto detectable, sino en cambio un segundo anticuerpo que reconoce el agente de ligación o anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-Fc) y se conjuga a un compuesto detectable se agrega al pocillo. En algunas modalidades, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el agente de ligación o anticuerpo se puede recubrir al pocillo y un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable se puede agregar después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Una persona de experiencia en el campo estaría bien informada en cuanto los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISAs conocidos en la técnica.

En otro ejemplo, la ligación especifica de un anticuerpo a VEGF humano y/o DLL4 humano se puede determinar usando el FACS. Un ensayo de clasificación FACS puede comprender generar un constructo de cADN que exprese un antígeno como una proteína de fusión, transfecte el constructo en las células, exprese el antígeno sobre la superficie de las células, mezcle el agente de ligación o anticuerpo con las

células transfectadas, e incube durante un período de tiempo. Las células ligadas por el agente de ligación o anticuerpo se pueden identificar al usar un anticuerpo secundario conjugado a un compuesto detectable. (Por ejemplo, anticuerpo anti-Fc conjugado con PE) y un citómetro de flujo. Una persona de experiencia en el campo estaría bien informado en cuanto a los parámetros que se pueden modificar para optimizar la señal detectada así como otras variaciones de FACS que pueden mejorar la clasificación (por ejemplo, clasificación para bloquear los anticuerpos).

La afinidad de ligación de un anticuerpo u otro agente de ligación a un antígeno (por ejemplo, VEGF o DLL4) y la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno se puede determinar por ensayos de ligación competitivos. Un ejemplo de un ensayo de ligación competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno etiquetado (por ejemplo, ^{3}H o ^{125}I), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades de incremento del antígeno no etiquetado seguido por la detección del anticuerpo ligado al antígeno etiquetado. La afinidad del anticuerpo para el antígeno y las constantes de disociación de ligación se puede determinar a partir de los datos por y el análisis gráfico de Scatchard. En algunas modalidades, el análisis cinético Biacore se usa para determinar la constante de asociación y disociación de

la ligación de los anticuerpos o agentes que se ligan a un antígeno (por ejemplo, VEGF o DLL4). El análisis cinético Biacore comprende analizar la ligación y la disociación de los anticuerpos de los chips con el antígeno inmovilizado (por ejemplo, VEGF o DLL4) sobre su superficie.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al VEGF humano, en donde el agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs del anticuerpo 219R45 (véase la Tabla 1). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una o más de las CDRs de 219R45, dos o más de las CDRs de 219R45, tres o más de las CDRs de 219R45, cuatro o más de las CDRs de 219R45, cinco o más de las CDRs de 219R45, o seis de las CDRs de 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF humano y VEGF de ratón.

Tabla 1

	219R45
HC CDR1	NYWMH (SEQ ID NO:17)
HC CDR2	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)
HC CDR3	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK

	219R45
	(SEQ ID NO:20)
LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al VEGF humano, en donde el agente de ligación a VEGF comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una

CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el agente de ligación a VEGF comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se

liga específicamente VEGF, en donde el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID

NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:49, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo de ligación a VEGF u otro agente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:7, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 0.01nM o menor. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del agente de ligación a VEGF se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del agente de ligación a VEGF para VEGF se altera. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a VEGF se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a VEGF se disminuye. En algunas modalidades, el agente de

ligación a VEGF se liga a VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF humano y VEGF de ratón.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 219R45 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF es el anticuerpo 219R45.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 219R45.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF como un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a VEGF es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa con el epítopo en el VEGF ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF como el anticuerpo 219R45. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa con el epítopo en el VEGF ligado por el anticuerpo

219R45.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF inhibe la ligación de VEGF humano a VEGFR-1 o VEGFR-2. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga específicamente VEGF y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga específicamente VEGF e inhibe la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga específicamente VEGF e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis de las CDRs del anticuerpo 21R79 (véase la Tabla 2). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R79, dos o más de las CDRs 21R79, tres o más de las CDRs 21R79, cuatro o más de las CDRs 21R79, cinco o más de las CDRs 21R79, o seis de las CDRs 21R79. En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una, dos , tres, cuatro, cinco, y/o seis de las

CDRs del anticuerpo (véase la Tabla 2). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R75, dos o más de las CDRs 21R75, tres o más de las CDRs 21R75, cuatro o más de las 21R75, cinco o más de las CDRs 21R75, o seis de las CDRs 21R75. En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs del anticuerpo 21R83 (véase la Tabla 2). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R83, dos o más de las CDRs 21R83, tres o más de las CDRs 21R83, cuatro o más de las CDRs 21R83, cinco o más de las CDRs 21R83, o seis de las CDRs de 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 humano y DLL4 de ratón.

Tabla 2

	21R79	21R75	21R83
HC CDR1	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)
HC CDR2	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)
HC CDR3	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)

	21R79	21R75	21R83
LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

En ciertas modalidades, la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo de ligación a DLL4 es una HC CDR1 mínima que comprende AYYIH (SEQ ID NO:79).

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que se liga al DLL4 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada

que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena

pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10. En ciertas

modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:48, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo de ligación a DLL4 u otro agente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:6, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que

comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4

comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:56, y una cadena

ligera que comprende SEQ ID NO:8.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de

ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID

NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende

una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:62, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente es un anticuerpo biespecífico.

En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:5, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de 25nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de 10nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 0.01nM o menor. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del agente de ligación a DLL4 se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad de agente de ligación a DLL4 para DLL4 se altera. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a DLL4 se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a DLL4 se disminuye.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4

comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R79 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 es el anticuerpo 21R79.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R79.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R75 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 es el anticuerpo 21R75.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R75.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R83 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, el agente de

ligación a DLL4 es el anticuerpo 21R83.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R83.

En algunas modalidades, un agente de ligación a DLL4 se liga a un fragmento N-terminal de DLL4 humano (aminoácidos 1-191 de SEQ ID NO:24). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a un epítopo que comprende los aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a un epítopo que comprende los aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a un epítopo que comprende los aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25 y los aminoácidos 113-120 d SEQ ID NO:25.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 as un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como el anticuerpo 21R79. En otra modalidad, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa

por el epítopo en DLL4 ligado por el anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como un anticuerpo 21R75. En otra modalidad, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por el anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como el anticuerpo 21R83. En otra modalidad, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por el anticuerpo 21R83.

En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En ciertas modalidades, el receptor Notch es Notch1, Notch2, Notch3, o Notch4. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 e inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4

se liga específicamente DLL4 e inhibe la tumorigenicidad. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 y reduce el número de frecuencia de CSCs en un tumor.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente al VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga a un objetivo asociado al tumor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que

comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%,

por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga a un objetivo asociado a tumor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina,

asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende

YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID

NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) que se liga específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a

VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R79.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a

antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21M18.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R75.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico

comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R83.

En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64, y

una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena

ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena

ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable

de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una

región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21M18. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R79 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21M18 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una

región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R75 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R83 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio CH3 y un segundo dominio CH3, cada uno de los cuales se modifica para promover la formación de heteromultímeros. En algunas modalidades, el primero y segundo dominios CH3 se modifican usando una técnica de perillas en agujeros. En algunas modalidades, el primero y segundo dominios CH3 comprenden cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones electrostáticas alteradas. En algunas modalidades, el primero y segundo dominios CH3 comprenden cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas alteradas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende regiones constantes de cadena pesada seleccionado del grupo

que consiste de: (a) una primera región constante IgG1 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 253 y 292 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG1 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 240 y 282 se sustituyen con lisina; (b) una primera región constante IgG2 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 249 y 288 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 236 y 278 se sustituyen con lisina; (c) una primera región constante IgG3 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 300 y 339 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG3 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 287 y 329 se sustituyen con lisina; y (d) una primera región constante IgG4 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 250 y 289 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG4 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 237 y 279 se sustituyen con lisina.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG1 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 253 y 292, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG1 humana con sustituciones de aminoácido en las

posiciones 240 y 282, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG3 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 300 y 339, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 287 y 329, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG4 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 250 y 289, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG4 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 237 y 279, en donde los aminoácidos son lisina.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de

aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:5. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:56. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:62. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además una cadena ligera de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID

NO:5, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:6, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:56, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:62, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 50nM o menor, aproximadamente 25nM o menor, aproximadamente 10nM o menor, aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50nM o menor, aproximadamente 25nM o menor, aproximadamente 10nM o menor, aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 50nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50nM o menor.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 25nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 25nM o menor. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 10nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 1nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno con una afinidad de ligación que es más débil que la afinidad de ligación del segundo sitio de ligación a antígeno. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM y puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM. O el anticuerpo biespecífico puede ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM y puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM y puede ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM. O el anticuerpo biespecífico puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM y puede

ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM en algunas modalidades, la diferencia en la afinidad entre los dos sitios de ligación a antígeno puede ser de aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 15 veces o más, aproximadamente 30 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, o aproximadamente 100 veces o más. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del sitio de ligación a antígeno para VEGF se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del sitio de ligación a antígeno se altera. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a VEGF se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a VEGF se disminuye. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del sitio de ligación a antígeno para DLL4 se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del sitio de ligación a DLL4 se altera. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a DLL4 se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a DLL4 se disminuye. En algunas modalidades, las afinidades de los sitios de ligación a antígeno de tanto el VEGF como DLL4 se alteARNn.

La invención proporciona polipéptidos, que incluyen pero

no se limitan a anticuerpos, que se ligan específicamente a VEGF y/o DLL4. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a VEGF humano. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a DLL4 humano. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a VEGF humano y VEGF de ratón. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a DLL4 humano y DLL4 de ratón.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49.

En algunas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ NO ID:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID

NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID

NO:64. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) compite para la ligación específica a VEGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 compite con un anticuerpo 219R45 para la ligación específica a VEGF humano. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo compite para la ligación específica a VEGF en un ensayo de ligación específica competitiva. En algunas modalidades, el VEGF es VEGF humano. En algunas modalidades, el VEGF es VEGF de ratón.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF-DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF as un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa por el epítopo en VEGF ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF

como un anticuerpo 219R45. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa por el epítopo en VEGF ligado por anticuerpo 219R45.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF con el anticuerpo 219R45 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo).

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) compite para la ligación específica a DLL4 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R79 para la ligación específica a DLL4 humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R75 para la ligación específica a DLL4 humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R83 para la ligación específica a DLL4 humano. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo compite para la ligación específica a DLL4 en un ensayo de ligación específica competitiva. En algunas modalidades, el DLL4 es DLL4 humano. En algunas modalidades, el DLL4 es DLL4 de ratón.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como anticuerpo 21R83. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por anticuerpo 21R79. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por anticuerpo 21R75. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por anticuerpo 21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación

específica a DLL4 con el anticuerpo 21R79 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a DLL4 con el anticuerpo 21R75 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a DLL4 con el anticuerpo 21R83 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a DLL4 con el anticuerpo 21M18 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M79 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M75 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a

VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M83 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente se liga a VEGF y modula la actividad de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe la actividad de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente se liga a DLL4 humano y modula la actividad de DLL4. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de Notch. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un

antagonista DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 y promueve la angiogénesis aberrante. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF humano y modula la actividad de VEGF. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente es un anticuerpo biespecífico que se liga a DLL4 humano y modula la actividad de DLL4. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF humano y DLL4 humano y modula la actividad tanto de VEGF como DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe la actividad tanto de VEGF como actividad de DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista de DLL4 e inhibe la actividad de VEGF y la actividad Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de VEGF y la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un

antagonista VEGF y un antagonista DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 y promueve la angiogénesis aberrante. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe angiogénesis. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo o un anticuerpo biespecífico) es un antagonista de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de VEGF e inhibe la actividad de VEGF. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la actividad VEGF por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es un anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico

219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) es un antagonista de DLL4. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la actividad de DLL4 por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la

actividad de DLL4 humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) es un antagonista de la señalización Notch. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la señalización Notch por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo

menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico

219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de VEGF a VEGFR-1 o VEGFR-2. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es un anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo

menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la ligación de la proteína DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de DLL4 a Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a

por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de ligación a VEGF/DLL4 (o agente de ligación a VEGF/DLL4 candidato) inhibe el VEGF o afecta la angiogénesis

son conocidos en el campo. Los ensayos *in vitro* de angiogénesis incluyen pero no se limitan a, ensayos de proliferación de HUVEC, ensayos de formación de tubo de células endoteliales, ensayos de proliferación (o formación de brotes), ensayos de migración de células HUVEC, y ensayos de invasión. En algunas modalidades, las células en la presencia de VEGF y la presencia de un agente de ligación a VEGF/DLL4 se comparan a las células en presencia de VEGF sin el agente de ligación a VEGF/DLL4 presente, y se evalúan para efectos en la angiogénesis (o efectos biológicos asociados con la angiogénesis). Los ensayos *in vivo* de la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, ensayos de enchufe matrigel, ensayos de microcavidades corneales, y ensayos de membrana corioalantóica de pollo (CAM, por sus siglas en inglés).

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de ligación a VEGF/DLL4 (o agente de ligación a VEGF/DLL4 candidato) inhibe la activación o señalización Notch son conocidos en el campo. Por ejemplo, los ensayos reporteros de luciferasa, basados en células que usan un vector reportero TCF/Luc que comprende múltiples copias del dominio de ligación a TCF de cadena arriba de un gen reportero de luciferasa de luciérnaga se pueden usar para medir los niveles de señalización Notch *in vitro* (Gazit y colaboradores, 1999, *Oncogene,* 18; 5959-66; TOPflash, Millipore, Billerica MA). En algunas modalidades, un ensayo

reportero de luciferasa, basado en células que usa un vector reportero a CBF/Luc que contiene múltiples copias del dominio de ligación a CBF de cadena arriba de los genes reporteros de luciferasa de luciérnaga se pueden usar. El nivel de la señalización Notch en presencia de uno o más ligandos Notch (por ejemplo, DLL4 expresado sobre la superficie de células transfectadas o proteína de fusión DLL4-Fc soluble) y en presencia de un agente de ligación a VEGF/DLL4 se compara con el nivel de la señalización Notch sin el agente de ligación a VEGF/DLL4 presente.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células tumorales, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, desencadenar la muerte celular de células tumorales, prevenir la metástasis de células tumorales, disminuir la supervivencia de las células tumorales, modular la angiogénesis, inhibir la angiogénesis, inhibir la angiogénesis productora, o promover la angiogénesis aberrante.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* (por

ejemplo, en un modelo de ratón de xenoinjerto, y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas modalidades, el crecimiento tumoral se inhibe por lo menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces como es comparado con un tumor no tratado.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de reducir la tumorigenicidad de un tumor. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, tal como un modelo de xenoinjerto de ratón. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor al disminuir el número o frecuencia de células madre cancerosas en el tumor. En ciertas modalidades, el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se reduce por lo menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces. En ciertas modalidades, la reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas se determina al limitar el ensayo de dilución usando un modelo animal. Ejemplos adicionales y guía con

respecto al uso para limitar los ensayos de dilución para determinar una reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se puede encontrar, por ejemplo, en el Número de Publicación Internacional WO 2008/042236; Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0064049; y Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0178305.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de modular la angiogénesis. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de modular la angiogénesis *in vivo* (por ejemplo, en un modelo de ratón de xenoinjerto, y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir la angiogénesis. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de promover la angiogénesis aberrante. En ciertas modalidades, Los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir la angiogénesis y/o promover la angiogénesis aberrante, conduciendo a vascularización no productiva.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente tiene una vida media circulante en ratones, monos cynomolgus, o humanos de por lo menos aproximadamente 2 horas, por lo menos aproximadamente 5 horas, por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 3 días, por lo menos aproximadamente 1 semana, o por lo menos

aproximadamente 2 semanas. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG2) que tiene una vida media circulante en ratones, monos cynomolgus, o humanos de por lo menos aproximadamente 2 horas, por lo menos aproximadamente 5 horas, por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 3 días, por lo menos aproximadamente 1 semana, o por lo menos aproximadamente 2 semanas. Los métodos para incrementar (o disminuir) la vida media de agentes tales como polipéptidos y anticuerpos son conocidos en el campo. Por ejemplo, los métodos conocidos para incrementar la vida media circulante de los anticuerpos IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc que incrementa la ligación dependiente de pH del anticuerpo al receptor Fc neonatal (FcRn) en pH 6.0 (véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente de E.U.A. Nos. 2005/0276799, 2007/0148164, y 2007/0122403). Métodos conocidos para incrementar la vida media circulante de fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc incluyen tales técnicas como PEGilación.

En algunas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son anticuerpos. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido. En algunas modalidades, los anticuerpos policlonales se producen al inmunizar un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón,

cabra, burro) con unan un antígeno de interés (por ejemplo, un fragmento de péptido purificado, proteína recombinante de longitud completa, o proteína de fusión por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El antígeno se puede conjugar opcionalmente a un portador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) o albúmina de suero. El antígeno (con o sin una proteína portadora) se diluye en solución salina estéril y se combina usualmente con un adyuvante (por ejemplo, Adyuvante de Freund Completo o Incompleto) para formar una emulsión estable. Después de un breve de tiempo suficiente, los anticuerpos policlonales se recubren del animal inmunizado, usualmente de sangre o ascitis. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar de suero o ascitis de acuerdo con los métodos estándares en el campo incluyendo, pero no limitado a, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio de iones, electroforesis en gel y diálisis.

En algunas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma conocidos por una persona de experiencia en el campo (véase por ejemplo, Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497). En algunas modalidades, el uso del método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal hospedero apropiado, se inmuniza como se describe en lo anterior para inducir de los

linfocitos la producción de anticuerpos que se ligan específicamente al antígeno de inmunización. En algunas modalidades, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. En algunas modalidades, el antígeno de inmunización puede ser una proteína humana o una porción de la misma. En algunas modalidades, el antígeno de inmunización puede ser una proteína de ratón o una porción de la misma.

Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea de células de mieloma adecuadas, usando, por ejemplo, polietilenglicol. Las células de hibridoma se seleccionan usando medios especializados como son conocidos en el campo y los linfocitos no fusionados y las células de mieloma no sobreviven al proceso de selección. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos contra específicamente un antígeno elegido se puede identificar por una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, inmunoprecipitación, inmunotinción, y ensayos de ligación *in vitro* (por ejemplo, citometría de flujo, FACS, ELISA, y radioinmunoensayo). Los hibridomas se pueden propagar ya sea en cultivo *in vitro* usando métodos estándares (J.W. Goding, 1996, *Anticuerpos monoclonales: Principles and Practice*, *3ª Edición*, Academic Press, San Diego, CA) o *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar del medio de cultivo o fluido ascítico de acuerdo con los métodos estándares en la

técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, y diálisis.

En ciertas modalidades, anticuerpos monoclonales se pueden elaborar usando técnicas de ADN recombinantes como es conocido por una persona experta en el campo. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y su secuencia se determina usando técnicas estándares. Los polinucleótidos aislados que codifican loas cadenas pesadas y ligeras luego se clonan en vectores de expresión adecuados que producen los anticuerpos monoclonales cuando se transfectan en células hospederas tales como E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), o células de mieloma que de otra manera no producen proteínas de inmunoglobulina.

En ciertas otras modalidades, los anticuerpos monoclonales recombinantes, o fragmentos de los mismos, se pueden aislar de bibliotecas de expresión en fago que expresan dominios variables o CDRs de una especie deseada (véase por ejemplo, McCafferty y colaboradores, 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson y colaboradores, 1991, *Nature*, 352:624-

628; y Marks y colaboradores, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

El polinucleótido(s) que codifica un anticuerpo monoclonal se puede modificar, por ejemplo, al usar tecnología de ADN recombinante para genera anticuerpos alternativos. En algunas modalidades, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden sustituir para esas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico, o para un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas modalidades, las regiones constantes se truncan o remueven para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable se puede usar para utilizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal contra VEGF y/o DLL4 es un anticuerpo humanizado. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las CDRs se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tienen la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación usando métodos conocidos por una persona experta en el campo. En algunas modalidades,

los residuos de región de estructura Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad del anticuerpo, afinidad y/o capacidad. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos una, y típicamente dos tres, regiones de dominio variables que contienen todas o sustancialmente todas, de las CDRs que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, de las regiones de estructuras son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. En ciertas modalidades, tales anticuerpos humanizados se usan terapéuticamente debido a que pueden reducir la antigenicidad y respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administra a un sujeto humano. Una persona experta en el campo sería capaz de obtener un anticuerpo humanizado

funcional con inmunogenicidad reducida siguiendo las técnicas conocidas (véase por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; y 5,693,762).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar directamente usando varias técnicas conocidas en el campo. En algunas modalidades, los anticuerpos humanos se pueden generar de linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o de linfocitos aislados de un individuo inmunizado. En cualquier caso, las células que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo se pueden generar y aislar (véase, por ejemplo, Cole y colaboradores, 1985, *Anticuerpos monoclonales and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer y colaboradores, 1991, *J. Immunol.*, 147:86-95; y Patentes de E.U.A. Nos. 5,750,373; 5,567,610; y 5,229,275). En algunas modalidades, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca en fago, donde la biblioteca en fago expresa anticuerpos humanos (Vaughan y colaboradores, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y colaboradores, 1998, *PNAS,* 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.,* 227:381; Marks y colaboradores, 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581). Alternativamente, la tecnología de expresión en fago se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variables de inmunoglobulina

de donadores inmunizados. Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas en fago de anticuerpos también se describen en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe y colaboradores, 2008, *J. Mol. Bio.*, 376:1182-1200. Una vez que los anticuerpos se identifican, las estrategias de maduración por afinidad conocidas en el campo incluyendo pero no limitado a, transposición de cadena (Marks y colaboradores, 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783) y mutagénesis dirigida al sitio, se pueden emplear para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

En algunas modalidades, los anticuerpos humanos se pueden hacer en ratones transgénicos que contienen sitios de inmunoglobulina humana. En la inmunización estos ratones son capaces de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este procedimiento se describe en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

Esta invención también abarca anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son capaces de reconocer y ligar específicamente por lo menos dos antígenos o epítopos diferentes. Los epítopos diferentes pueden estar ya sea dentro de la misma molécula (por ejemplo, dos epítopos en una

sola proteína) o en diferentes moléculas (por ejemplo, un epítopo en una proteína y un epítopo en una segunda proteína). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene potencia mejorada como es comparado con un anticuerpo individual o una combinación de más de un anticuerpo. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene toxicidad reducida como es comparado con un anticuerpo individual o a una combinación de más de un anticuerpo. Es conocido por aquellas personas de experiencia en el campo que cualquier agente de ligación (por ejemplo, anticuerpo) puede tener farmacocinética única (PK) (por ejemplo, línea media circulante). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de sincronizar la PK de dos agentes de ligación activos en donde los dos agentes de ligación individuales tienen diferentes perfiles de PK. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de concentrar las acciones de dos agentes de ligación (por ejemplo, anticuerpos) en un área común (por ejemplo, un tumor y/o entorno de tumor). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de concentrar las acciones de dos agentes de ligación (por ejemplo, anticuerpos) a un objetivo común (por ejemplo, un tumor o una célula tumoral). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tienen la capacidad de fijar como objetivo las acciones de dos agentes de ligación (por

ejemplo, anticuerpos) a más de una ruta o función biológica.

En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF y un segundo objetivo. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a DLL4 y un segundo objetivo. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano monoclonal o humano humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico inhibe la angiogénesis y reduce el número o frecuencia de células madre cancerosas. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos e inhibe la maduración de vasos sanguíneos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico previene la hiperproliferación endotelial. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene toxicidad disminuida y/o efectos secundarios. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene toxicidad disminuida y/o efectos secundarios como es comparado con una mezcla de los dos anticuerpos individuales o los anticuerpos como agentes individuales. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene un índice terapéutico incrementado. En algunas modalidades, el anticuerpo

biespecífico tiene un índice terapéutico incrementado como es comparado con una mezcla de los dos anticuerpos individuales o los anticuerpos como agentes individuales.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede reconocer específicamente y ligarse a un primer objetivo de antígeno, (por ejemplo, DLL4) así como un segundo objetivo de antígeno, tal como una molécula efectora en un leucocito (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7) o un receptor Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celulares a la célula que expresa el primer objetivo de antígeno. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para dirigir los agentes de citotoxicidad a las células que expresan un antígeno objetivo particular. Estos anticuerpos poseen un sitio de ligación a antígeno (por ejemplo, a DLL4 humano) y un segundo sitio que se liga a un agente citotóxico o un quelante de radionucleídos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA.

Las técnicas para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidas por aquellas personas expertas en el campo, véase por ejemplo, Millstein y colaboradores, 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan y colaboradores, 1985, *Science*, 229:81; Suresh y colaboradores, 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Traunecker y colaboradores, 1991, *EMBO J.,* 10:3655-3659; Shalaby y colaboradores, 1992, *J. Exp. Med.,* 175:217-225; Kostelny y colaboradores, 1992, *J. Immunol.,* 148:1547-1553;

Gruber y colaboradores, 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; Patente de E.U.A. No. 5,731,168; Publicación Internacional No. WO 2009/089004; y Publicación de Patente de E.U.A. No. 2011/0123532. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos comprenden regiones constantes de cadena pesada o modificaciones en los aminoácidos que son parte de la interface entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar usando una estrategia de “perillas en agujeros” (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 5,731,168; Ridgway y colaboradores, 1996, *Prot. Engin.*, 9:617-621). Algunas veces la terminología de “perillas” y “agujeros” se reemplaza con los términos “protuberancias” y “cavidades”. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden comprender regiones bisagra variantes incapaces de formar ligaciones de disulfuro entre las cadenas pesadas (véase, por ejemplo, WO 2006/028936). En algunas modalidades, las modificaciones pueden comprender cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones electrostáticas alteradas. En algunas modalidades, las modificaciones pueden comprender cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas alteradas.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmento de anticuerpo que comprende sitios de ligación a antígeno. Los anticuerpos con más de dos valencias

también se contemplan. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparan (Tutt y colaboradores, 1991, *J. Immunol.*, 147:60). De esta manera, en ciertas modalidades los anticuerpos a VEGF y/o DLL4 son multiespecíficos.

En ciertas modalidades, los anticuerpos (u otros polipéptidos) descritos en la presente pueden ser monoespecíficos. En ciertas modalidades, cada uno del uno o más sitios de ligación a antígeno que un anticuerpo contiene es capaz de ligarse (o ligarse) a un epítopo homólogo en diferentes proteínas.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden tener diferentes funciones o capacidades que los anticuerpos intactos; por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden tener penetración incrementada del tumor. Varias técnicas son conocidas para la producción de los fragmentos de anticuerpo incluyendo, pero no limitado a, digestión proteolítica de anticuerpos intactos. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento F(ab')2 producido por la digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')2. En otras modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula

de anticuerpo con papaína y un agente reductor. En ciertas modalidades, los fragmentos de anticuerpo se producen recombinantemente. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen Fv o fragmentos de Fv de cadena individual (scFv). Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, y scFv se pueden expresar en y secretar de E. coli u otras células hospederas, permitiendo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo se aíslan de las bibliotecas de fago de anticuerpos como se plantea en la presente. Por ejemplo, los métodos se pueden usar para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse y colaboradores, 1989, *Science*, 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para VEGF y/o DLL4 o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de anticuerpo lineales. En ciertas modalidades, los fragmentos de anticuerpo son monoespecíficos o biespecíficos. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un scFv. Se pueden usar varias técnicas para la producción de anticuerpos de cadena individual específicos a VEGF o DLL4 (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4,946,778).

Además puede ser deseable, especialmente en el caso de los fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo a fin

de alterar (por ejemplo, incrementar o disminuir) su vida media en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de ligación a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o al incorporar el epítopo en una etiqueta de péptido que luego se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte intermedia (por ejemplo, por síntesis de ADN o péptidos).

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para fijar como objetivo células inmunes a células no deseadas (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4,676,980). También se contempla que los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteína sintética, incluyendo aquellas que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir usado una reacción de intercambio de disulfuro o al formar una ligación de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Para los propósitos de la presente invención, se debe apreciar que los anticuerpos modificados pueden comprender

cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con el objetivo (es decir, VEGF humano o DLL4 humano). En este aspecto, la región variable puede comprender o ser derivado de cualquier tipo de mamífero que se pueda inducir a totalizar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o de origen de conejo. En algunas modalidades, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras modalidades, las regiones variables de los anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente no humana) se pueden diseñar o adaptar específicamente para mejorar las propiedades de ligación o para reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este aspecto, las regiones variables útiles en la presente invención se pueden humanizar o alterar de otra manera a través de la inclusión de secuencias de aminoácido importadas.

En ciertas modalidades, los dominios variables en tanto las cadenas pesadas como ligeras se alteran por el reemplazo o por lo menos parcial de una o más CDRs y, si es necesario, por el reemplazo de la región de estructura parcial y la modificación y/o alteración de secuencia. Aunque las CDRs se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o aún

subclase como el anticuerpo del cual las regiones de estructura se derivan, se prevé que las CDRs se pueden derivar de un anticuerpo de diferente clase y frecuentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDRs con todas las CDRs de una región variable donadora para transferir la capacidad de ligación a antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede ser solo necesario transferir esos residuos que son requeridos para mantener la actividad del sitio de ligación a antígeno.

Las alteraciones a la región variable no obstante, aquellos expertos en el campo apreciarán que los anticuerpos modificados de esta invención comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunoreactivos de los mismos) en los cuales por lo menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han detectado o de otra manera alterado para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como localización incrementada de tumor o vida media de suero incrementada cuando se compara con anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante relativa o inalterada. En algunas modalidades, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatible con esta invención comprenden adiciones, supresiones o

sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Los anticuerpos modificados dados a conocer en la presente pueden contener alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En algunas modalidades, uno o más dominios se suprimen parcial o completamente de las regiones constantes de los anticuerpos modificados. En algunas modalidades, los anticuerpos modificados comprenderán constructos o variantes suprimidos de dominio en donde el dominio CH2 completo se ha removido (constructos ΔCH2). En algunas modalidades, el dominio de región constante omitido se reemplazó por un espaciador de aminoácido corto (por ejemplo, residuos de 10 aminoácidos) que proporcionan algo de la flexibilidad molecular impartida típicamente por la región constante ausente.

En algunas modalidades, los anticuerpos modificados se diseñan para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra del anticuerpo. En otras modalidades, un espaciador de péptido se inserta entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, los constructos se pueden expresar en donde el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Tal espaciador se puede agregar para asegura que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que

la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, cabe destacar que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, probar ser inmunogénicos e inducen una respuesta inmune indeseada contra el constructo. Por consiguiente, en ciertas modalidades, cualquier espaciador agregado al constructo será relativamente no inmunogénico para mantener las calidades biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

En algunas modalidades, los anticuerpos modificados pueden tener solamente una supresión parcial de un dominio o sustitución constante de pocos o aún un aminoácido individual. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en las áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la ligación de Fc e incrementar en consecuencia la localización de la célula cancerosa y/o penetración del tumor. Similarmente, puede ser deseable simplemente suprimir la parte de uno o más dominios de región constante que controlan una función efectora específica (por ejemplo ligación de C1q de complemento) que se modula. Tales supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) mientras que dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante sujeto. Por otra parte, como se alude en o anterior, las regiones constantes de los anticuerpos

divulgados y dados a conocer se pueden modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil del consultor resultante. En este aspecto puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de ligación conservado (por ejemplo, ligación a Fc) mientras que mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. En ciertas modalidades, los anticuerpos modificados comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables tal como disminuir o incrementar la función efectora y proporcionar más sitios de unión de citotoxina o carbohidratos.

Es conocido en el campo que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la ligación del componente C1 del complemento a la región Fc de los anticuerpos IgG o IgM (ligados al antígeno) activa el sistema complementario. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también activa la respuesta inflamatoria y también se puede aplicar en la hipersensibilidad autoinmune. Además, la región Fc de un anticuerpo puede ligarse a una respuesta que expresa un receptor Fc (FcR). Existe una variedad de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon),

IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La ligación del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una variedad de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo el agobio y destrucción de las partículas recubiertas con anticuerpo, eliminación de los complejos inmunes, lisis de las células objetivo recubiertas con anticuerpo por células exterminadoras (llamado citotoxicidad de células dependientes de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina.

En ciertas modalidades, los anticuerpos modificados proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, en algunas modalidades, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la ligación del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de esta manera la localización de células cancerosas y/o penetración del tumor. En otras modalidades, las modificaciones de la región constante incrementan la vida media en suero del anticuerpo. En otras modalidades, las modificaciones de región constante reducen la vida media en suero del anticuerpo. En algunas modalidades, la región constante se modifica para eliminar las ligaciones de disulfuro o porciones de oligosacáridos. Las modificaciones a

la región constante de acuerdo con esta invención se pueden hacer fácilmente usando técnicas de ingeniería bioquímica molecular bien conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo no tiene actividad de ADCC, y/o ninguna actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En ciertas modalidades, el anticuerpo no se liga a un receptor Fc, y/o factores de complemento. En ciertas modalidades, el anticuerpo no tiene una función efectora.

La presente invención abarca además variantes equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, expuestos en la presente. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustituciones conservadoras, es decir la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se propone para una sustitución de aminoácido

conservadora es bien conocido en el campo y se describe en la presente.

De esta manera, la presente invención proporciona métodos para producir un anticuerpo que se liga a VEGF y/o DLL4, incluyendo anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente a tanto VEGF como DLL4. En algunas modalidades, el método para producir un anticuerpo que se liga a VEGF y/o DLL4 comprende el uso de técnicas de hibridoma. En algunas modalidades, el método para generar un anticuerpo que se liga a VEGF o DLL4 o un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4 comprende la clasificación de una biblioteca en fago humana. La presente invención proporciona además métodos para identificar un anticuerpo que se liga a VEGF y/o DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para ligarse a VEGF o una porción del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para ligarse a DLL4 o una porción del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación de FACS para ligarse tanto a VEGF como a DLL4 o una porción de los mismos. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando ELISA para la ligación a VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando el ELISA para la ligación a DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la

clasificación usando el ELISA para ligarse a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para el bloqueo de la ligación de VEGF humano a un receptor VEGF humano. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para el bloqueo de la ligación de DLL4 humano a un receptor Notch humano. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la inhibición o bloqueo de la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la inhibición o bloqueo de la actividad de VEGF (por ejemplo, inducción de proliferación de HUVEC). En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la modulación del angiogénesis.

En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo VEGF humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende los aminoácidos 27-232 de VEGF humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo a VEGF humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano. En algunas modalidades, el método comprende además aislar los anticuerpos o células productoras de anticuerpos del mamífero. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se liga a VEGF comprende: inmunizar un mamífero con un

polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano, y aislar las células productoras de anticuerpos del mamífero inmunizado. En algunas modalidades, el método comprende además fusionar las células productoras de anticuerpos con células de una línea de células de mieloma para formar células de hibridoma. En algunas modalidades, el método el método comprende además seleccionar una célula de hibridoma que expresa un anticuerpo que se liga al VEGF. En ciertas modalidades, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, el anticuerpo se selecciona usando un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano.

En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo al DLL4 humano comprende inmunizar un mamífero con una polipéptido que comprende los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo al DLL4 humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se liga a DLL4 comprende: inmunizar un mamífero con una polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano, y aislar las células productoras del anticuerpo del mamífero inmunizado. En algunas modalidades, el método comprende además fusionar las células productoras

de anticuerpos con células de una línea de células de mieloma para formar células de hibridoma. En algunas modalidades, el método comprende además seleccionar una célula de hibridoma que expresa un anticuerpo que se liga a DLL4. En ciertas modalidades, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, el anticuerpo se selecciona usando un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano.

En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo a VEGF humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos que se ligan a VEGF humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo DLL4 humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos que se ligan al DLL4 humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo al VEGF humano y/o al DLL4 humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos biespecíficos que se ligan al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, la biblioteca de expresión de anticuerpos es una biblioteca de fagos. En algunas modalidades, la clasificación comprende inmunoplaqueteo. En algunas modalidades, la biblioteca de expresión de anticuerpos (por ejemplo, una biblioteca de fagos) se clasifica usando por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano. En algunas modalidades, los

anticuerpos identificados en la primera clasificación, se clasifican contra el uso de por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano para identificar un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, la biblioteca de expresión de anticuerpos (por ejemplo, una biblioteca de fagos) se clasifica usando por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas modalidades, los anticuerpos identificados en la primera clasificación, se clasifican contra el uso de por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano para identificar un anticuerpo biespecífico que liga a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en las clasificaciones es un antagonista VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación inhibe las actividades biológicas inducidas por VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación es un antagonista DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación inhibe la señalización Notch inducida por DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación se liga tanto al VEGF humano como el VEGF de ratón. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación se liga a tanto el DLL4 humano como el DLL4 de ratón.

En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente se aíslan. En ciertas modalidades, los anticuerpos

descritos en la presente son sustancialmente puros.

En algunas modalidades de la presente invención, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se ligan a VEGF y/o DLL4. Se reconocerá en el campo que algunas secuencias de aminoácidos de los agentes de ligación descritos en la presente se pueden variar sin efecto significativo en la estructura o función de la proteína. De esta manera, la invención incluye además variaciones d los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra el VEGF humano y/o DLL4 humano. En algunas modalidades, las variaciones de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ligación a VEGF/DLL4 incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y/u otros tipos de sustituciones.

En algunas modalidades, los polipéptidos descritos en la presente se aíslan. En algunas modalidades, los polipéptidos descritos en la presente son sustancialmente puros.

Los polipéptidos, análogos y variantes de los mismos, se pueden modificar adicionalmente para contener porciones químicas adicionales no normalmente parte del polipéptido. Las porciones derivadas pueden mejorar o de otra manera modular la solubilidad, la vida media biológica, y/o

absorción del polipéptido. Las porciones también pueden reducir o eliminar los efectos secundarios indeseables de los polipéptidos y variantes. Un estudio general para las pociones químicas se puede encontrar en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *21ª Edición*, 2005, University of the Sciences, Filadelfia, PA.

El polipéptidos descrito en la presente se puede producir mediante cualquier método adecuado conocido en el campo. Tales métodos varían de métodos de síntesis de proteínas directos para construir una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos y que expresa esa secuencia en un hospedero adecuado. En algunas modalidades, una secuencia de ADN se construye usando tecnología recombinante al aislar o al sintetizar una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véase, por ejemplo, Zoeller y colaboradores, 1984, *PNAS,* 81:5662-5066 y Patente de E.U.A. No. 4,588,585.

En algunas modalidades, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se puede construir por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se pueden diseñar basados en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y al

seleccionar esos codones que son favorecidos en la célula hospedera en la cual el polipéptido recombinante de interés se producirá. Métodos estándares se pueden aplicar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos completa se puede usar para construir un gen de nuevo traducido. Además, un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular se puede sintetizar. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones de polipéptido deseado se pueden sintetizar y luego ligar. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente terminales 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio, u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido particular de interés se puede insertar en un vector de expresión y ligar operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para expresión de la proteína en un hospedero deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar por la secuenciación de nucleótidos, mapeo de enzimas de restricción, y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedero adecuado. Como se conoce bien en el campo, a fin de obtener niveles de expresión alta de un gen transfectado en un hospedero, el gen se debe ligar operativamente a la

secuencia de control de expresión transcripcionales y/o traduccionales que son funcionales en el hospedero de expresión elegido.

En ciertas modalidades, los vectores de expresión recombinantes se usan para amplificar y expresar los anticuerpos que codifican ADN, o fragmentos de los mismos, contra el VEGF y/o DLL4 humanos. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes pueden ser constructos de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN derivados de cADN sintéticos que codifican una cadena de polipéptidos de un agente de ligación a VEGF/DLL4, tal como un anticuerpo anti-VEGF o un anticuerpo anti-DLL4, o un fragmento del mismo, ligados operativamente a un elementos reguladores transcripcionales y/o traduccionales adecuados derivados de genes de mamífero, microbiano, virales, o de insecto. Una unidad transcripcional comprende generalmente un ensamblaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o de codificación que se transcribe en mARN y se traduce en proteína, y (3) secuencias de inicio y terminación de transcripción y traducción apropiadas. Los elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad de replicaciones en un hospedero, usualmente conferido por un

origen de replicación, y un gene de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están “operativamente ligadas” cuando se relacionan funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido de señal (líder secretor) se liga operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como un percusor el cual participa en la secreción del polipéptido; un promotor se liga operativamente a una secuencia de codificación si controla una transcripción de la secuencia; o un sitio de ligación a ribosoma se liga operativamente a una secuencia de codificación y se coloca para permitir la traducción. En algunas modalidades, los elementos estructurales propuestos para el uso en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedera. En otras modalidades, en situaciones donde la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Esto residuo se puede escindir de manera opcional subsecuentemente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de una secuencia de control de expresión y un vector de expresión depende de la elección del hospedero. Una pre-variedad de combinaciones de hospedero/vector de expresión se pueden emplear. Los vectores de expresión útiles

para los hospederos eucarióticos incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospederos bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de E. coli incluyendo pCR1, pBR322, pMB9, y sus derivados, y plásmidos de intervalo de hospedero más amplios, tal como M13 y otros fagos de ADN de hebra individual filamentosos.

Los agentes de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, polipéptidos) de la presente invención se pueden expresar de uno o más vectores. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido de cadena pesada se expresa por un vector, un segundo polipéptido de cadena pesada se expresa por un segundo vector y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un tercer vector. En algunas modalidades, un primer polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un vector y un segundo polipéptido de cadena pesada se expresa por un segundo vector. En algunas modalidades, los polipéptidos de cadena pesada se expresan por un vector y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un segundo vector. En algunas modalidades, tres polipéptidos se expresan de un vector. De esta manera, en algunas modalidades, un primer polipéptido de cadena pesada, un segundo polipéptido de cadena pesada, y un polipéptido de

cadena ligera se expresan por un vector individual.

Células hospederas adecuadas para la expresión de un polipéptido o anticuerpo de ligación a VEGF/DLL4 (o una proteína de VEGF o DLL4 para el uso como un antígeno) incluyen procariotas, células de levadura, células de insecto, o células eucarióticas superiores bajo el control de los promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo E. coli o Bacillus. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas de células establecidas de origen de mamífero como se describe a continuación. Los sistemas de traducción sin células también se emplean. Los vectores de clonación y expresión apropiados para el uso con hospederos celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen en Pouwels y colaboradores, 1985, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, NY. La información adicional con respecto a los métodos de producción de proteínas, incluyendo producción de anticuerpos, se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0187954; Patentes de E.U.A. Nos. 6,413,746; 6,660,501; Publicación de Patente Internacional No. WO 04/009823.

Varios sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto se pueden usar para expresar polipéptidos recombinantes. La expresión de proteínas recombinantes en

células de mamífero puede ser deseable debido a que estas proteínas esta generalmente de manera correcta plegadas, apropiadamente modificadas y biológicamente funcionales. Ejemplos de líneas de células hospederas de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, líneas de células COS-7 (derivadas de reunión de monos), L-929 (derivadas de fibroblastos de murino), C127 (derivadas de tumor mamario de murino) 3T3 (derivadas de fibroblasto de murino), CHO (derivadas de ovario de hámster Chino), HeLa (derivadas de cáncer cervical humanos), BHK (derivadas de fibroblasto de riñón de hámster), HEK-293 (derivadas de riñón embriónico humano) y variantes de estas líneas de células. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados ligados al gen que se expresa, y otra secuencia no transcrita de flanqueo 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitio de ligación a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores de empalme y aceptores, y secuencia de terminación transcripcionales. La expresión de proteína recombinante en baculovirus también ofrece un método sólido para producir proteínas correctamente plegadas y biológicamente funcionales. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son bien conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo

(véase, por ejemplo, Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

De esta manera, la presente invención proporciona células que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En algunas modalidades, las células producen los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo. En algunas modalidades, las células producen un agente de ligación a VEGF, tal como un anticuerpo anti-VEGF. En algunas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF. En algunas modalidades, las células producen un agente de ligación a DLL4, tal como un anticuerpo anti-DLL4. En algunas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que se liga a DLL4. En ciertas modalidades, las células producen un agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo

biespecífico que comprende un sito de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21M18. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo

biespecífico 219R45-MB-21R83.

Las proteínas producidas por un hospedero transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Los métodos estándares incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tal como hexa-histidina, dominio de ligación a maltosa, secuencia de recubrimiento de influenza, y glutationa-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir la fácil purificación por el pasaje sobre una columna de afinidad apropiada. La cromatografía de afinidad usada para la purificar inmunoglobulinas puede incluir cromatografía de Proteína A, Proteína G y Proteína L. las proteínas aisladas se pueden caracterizar físicamente usando tales técnicas como proteólisis, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), enfoque isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés), y cristalografía de rayos X. La pureza de las proteínas aisladas se pueden determinar usando técnicas conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo, incluyendo pero no limitado a, SDS-PAGE, SEC, electroforesis

en gel capilar, IEF, y enfoque isoeléctrico capilar (cIEF).

En algunas modalidades, los sobrenadantes del sistema de expresión que secretan proteína recombinante en los medios de cultivo primero se pueden concentrar usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultra filtración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el material concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. En algunas modalidades, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo pendientes (DEAE). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. En algunas modalidades, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. En algunas modalidades, se puede emplear un medio de hidroxiapatita, incluyendo pero no limitado a, hidroxiapatita de cerámica (CHT). En ciertas modalidades, una o más etapas de HPLC de fase inversa que emplea un medio RP-HPLC hidrofóbico, por ejemplo, gel de sílice que tienen grupos metilo pendientes u otros alifáticos, se pueden emplear para purificar adicionalmente una proteína recombinante (por ejemplo, un agente de ligación a VEGF/DLL4). Algo o todo de las etapas de purificación

anteriores, en varias combinaciones, se pueden emplear para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

En algunas modalidades, las proteínas heterodiméricas tales como anticuerpos biespecíficos se purifican de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se aíslan y/o purifican usando por los menos una etapa de cromatografía. En algunas modalidades, la por lo menos una etapa de cromatografía comprende cromatografía de afinidad. En algunas modalidades, la por lo menos una etapa de cromatografía comprende además cromatografía de intercambio aniónico. En algunas modalidades, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende por lo menos 90% de anticuerpo heterodimérico. En algunas modalidades, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de anticuerpo heterodimérico. En algunas modalidades, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende aproximadamente 100% de anticuerpo heterodimérico.

En algunas modalidades, la proteína recombinante producida en el cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, por extracción inicial de pelotillas de células, seguido por una o más de etapas de cromatografía de concentración, de salación, de intercambio de iónico a acuoso, o exclusión de tamaño. La HPLC se puede emplear para

etapas de purificación final. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden alterar por cualquier método conveniente, incluyendo ciclado de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisado celular.

Los métodos conocidos en el campo para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en las Publicación de Patentes de E.U.A. Nos. 2008/0312425; 2008/0177048; y 2009/0187005.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un polipéptido que no tiene un anticuerpo. Una variedad de métodos para identificar y producir polipéptidos no de anticuerpos que se ligan con alta afinidad a un objetivo de proteínas son objetivos en el campo. Véase, por ejemplo, Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse y colaboradores, 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill y colaboradores, 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; y Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83. En ciertas modalidades, la tecnología de expresión en fago o células de mamífero se pueden usar para producir e/o identificar un polipéptido de ligación a VEGF/DLL4 que no es un anticuerpo. En ciertas modalidades, el polipéptido comprende un andamio de proteínas de un tipo seleccionado del grupo que consiste de proteína A, proteína G, una lipocalina, un dominio de fibronectina, y un dominio

de repetición consenso de anquirina, y tioredoxina.

En ciertas modalidades, los agentes o anticuerpos de ligación a VEGF/DLL4 se pueden usar en cualquiera de una variedad de formas conjugadas (es decir, un inmunoconjugado o radioconjugado) o no conjugadas. En ciertas modalidades, los anticuerpos se pueden usar en una forma no conjugada para aprovechar los mecanismos de defensa naturales del sujeto incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento y toxicidad celular dependiente de anticuerpo para eliminar células malignas o cancerosas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo o polipéptido) se conjuga a un agente citotóxico. En algunas modalidades, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico que incluye, pero no se limita a, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercaladores. En algunas modalidades, el agente citotóxico es una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, cadena de difteria A, fragmentos activos no de ligación de toxina de difteria, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Pitolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica

charantia, curcina, crotina, inhibidor de Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos. En algunas modalidades, el agente citotóxico es un radioisótopo para producir radioconjugado o anticuerpo radio conjugado. Una variedad de radionúclidos son disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados incluyendo, pero no limitado a, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re y ^{212}Bi. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como caliqueamicinas, maitansinoides, tricotecenos, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se pueden usar. Los conjugados de un anticuerpo y agentes citotóxicos se pueden hacer usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales, incluyendo, pero no limitado a, propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiiditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl adipimidato de dimetilo), esteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutareldehído), compuestos bis-azido (tal como hexanodiamina de bis(p-azidobenzoilo)), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

III. Polinucleótidos

En ciertas modalidades, la invención abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido (o un fragmento de un polipéptido) que liga específicamente a VEGF, DLL4, tanto VEGF como DLL4. El término “polinucleótidos que codifican un polipéptido” abarca un polinucleótido que incluye solamente secuencia de codificación para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias de codificación y/o no de codificación adicionales. Por ejemplo, en algunas modalidades, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo al VEGF humano codifica un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que comprende el sitio de ligación a antígeno). En algunas modalidades, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo DLL4 humano o codifica un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que comprende el sitio de ligación a antígeno. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN. El ADN incluye cADN, ADN genómico, y ADN sintético; y puede ser de doble hebra o hebra individual, y si es de hebra individual puede ser la hebra de codificación o hebra no de codificación (anti-sentido)

En ciertas modalidades, el polinucleótido comprende un

polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En ciertas modalidades, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, y SEQ ID NO: 64. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78.

En ciertas modalidades, del polinucleótido comprende un

polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80% idéntica, por lo menos aproximadamente 85% idéntica, por lo menos aproximadamente 90% idéntica, por lo menos aproximadamente 95% idéntica, y en algunas modalidades, por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. En ciertas modalidades, el polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80% idéntica, por lo menos aproximadamente 85% idéntica, por lo menos aproximadamente 90% idéntica, por lo menos aproximadamente 95% idéntica, y en algunas modalidades, por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID

NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que se hibrida a SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. En ciertas modalidades, la hibridación está bajo condiciones de alta severidad.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos comprenden la secuencia de codificación para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedera (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido de la células). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una proteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedera para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proteína que es la proteína madura más los residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una pro-secuencia

es una proteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la pro-secuencia se escinde permanece una proteína activa madura.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos comprenden la secuencia de codificación para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexa-histidina suministrad por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedero bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de hemaglutinina de influenza cuando un hospedero mamífero (por ejemplo, células COS-7) se usa. En algunas modalidades, la secuencia marcadora es una etiqueta FLAG, un péptido de la secuencia DYKDDDDK (SEQ ID NO:45) que se puede usar en conjunción con otras etiquetas de afinidad.

La presente invención se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos, y/o derivados.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona polinucleótidos que comprende polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos por lo menos

aproximadamente 80% idéntica, por lo menos aproximadamente 85% idéntica, por lo menos aproximadamente 90% idéntica, por lo menos aproximadamente 95% idéntica, y en algunas modalidades, por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), o fragmento del mismo, descrito en la presente.

Como se usa en la presente, la frase un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95% “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia se propone para referirse a esa secuencia de nucleótidos de polinucleótidos que es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos de por lo menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido, o una variedad de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales y en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones 5' o 3' terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar

entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones de codificación, regiones no de codificación, o ambas. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido contiene alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones, o supresiones, pero no altera las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido comprende sustituciones silenciosas que da por resultado ningún cambio a la secuencia de aminoácidos del polipéptido (debido a la degeneración del código genético). Las variantes de polinucleótido se pueden producir por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un hospedero particular (es decir, cambiar los codones en el mARN humano a aquellos preferidos por un hospedero bacteriano tal como E. coli). En algunas modalidades, una variante de polinucleótido comprende por lo menos una mutación silenciosa en una región no de codificación o de codificación de la secuencia.

En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para modular o alterar la expresión (o niveles de expresión) del polipéptido codificado. En algunas

modalidades, una variante de polinucleótido se produce para incrementar la expresión del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para disminuir la expresión de polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido tiene expresión incrementada del polipéptido codificado como es comparado con una secuencia de polinucleótido parenteral. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido tiene expresión disminuida del polipéptido codificado como es comparado con una secuencia de polinucleótido parenteral.

En algunas modalidades, por lo menos una variante de polinucleótido se produce (sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado) para incrementar la producción de una molécula heteromultimérica. En algunas modalidades, por lo menos una variante de polinucleótido se produce (sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado) para incrementar la producción de un anticuerpo biespecífico.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos se aíslan. En ciertas modalidades, los polinucleótidos son sustancialmente puros.

Los vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en la presente también se proporcionan. En algunas modalidades, un vector de expresión

comprende una molécula de polinucleótidos. En algunas modalidades, una célula hospedera comprende un vector de expresión que comprende la molécula de polinucleótido. En algunas modalidades, una célula hospedera comprende una molécula de polinucleótido.

IV. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

Los agentes de ligación (incluyendo polipéptidos y anticuerpos) de la invención que se ligan (por ejemplo, se ligan específicamente) a VEGF y/o DLL4 son útiles en una variedad de aplicaciones incluyendo, pero no limitado a, métodos de tratamiento terapéuticos, tales como el tratamiento de cáncer. En ciertas modalidades, los agentes son útiles para inhibir la actividad de VEGF, inhibir la señalización Notch inducida por DLL4, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el volumen de tumor, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un tumor, modular la angiogénesis, y/o inhibir la angiogénesis. Los métodos de uso pueden ser *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de VEGF humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de DLL4 humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de tanto VEGF como DLL4.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a

VEGF/DLL4 se usan en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, es decir angiogénesis incrementada y/o angiogénesis aberrante. En ciertas modalidades, la enfermedad es una enfermedad dependiente de la angiogénesis. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 se usan en el tratamiento de trastornos caracterizados por niveles incrementados de células madre y/o células progenitoras.

La presente invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor usando los agentes de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpos descritos en la presente. En ciertas modalidades, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende poner en contacto una célula tumoral con un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, una línea de células inmortalizadas o una línea de células cancerosas se cultivan en el medio al cual se agrega un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-DLL4, o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas modalidades, las células tumorales se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión plural, o muestra de sangre y se cultiva en el medio al cual se agrega un agente de ligación a VEGF/DLL4 par a inhibir el crecimiento de células tumorales.

En algunas modalidades, el método para inhibir el

crecimiento de un tumor comprende poner en contacto un tumor o células tumorales con un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) *in vivo*. En ciertas modalidades, poner en contacto un tumor o célula tumoral con un agente de ligación a VEGF/DLL4 se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-DLL4, o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 se puede administrar a un animal hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que tienen un xenoinjerto de tumor. En algunas modalidades, las células tumorales y/o células madre cancerosas se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra de sangre y se inyecta en un animal hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que luego se les administra un agente de ligación a VEGF/DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de las células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento tumoral ("modelo preventivo"). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se administra como un producto terapéutico después de que el tumor se ha desarrollado a un tamaño especificado ("modelo terapéutico"). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente al

VEGF humano y DLL4 humano.

En ciertas modalidades, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4. En ciertas modalidades, el sujeto es un humano. En ciertas modalidades, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor que se removió. En ciertas modalidades, el tumor comprende células madre cancerosas. En ciertas modalidades, la frecuencia de células madre cancerosas en el tumor se reduce por la administración del agente de ligación a VEGF/DLL4. La invención también proporciona un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende poner en contacto el tumo con una cantidad efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4). En algunas modalidades, un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en un sujeto, comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4.

En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste de tumor colorectal, tumor de colon, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de la

vejiga, glioblastoma, y tumor de cabeza y cuello. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor colorectal o un tumor de colon. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor de ovario. En algunas modalidades, el tumor es un tumor de pulmón. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor pancreático. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor de mama.

La presente invención proporciona además métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4 a un sujeto. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a VEGF, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a DLL4, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a VEGF, interfiere con las interacciones del receptor VEGF/VEGF, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a DLL4, interfiere con las interacciones DLL4/Notch, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a tanto VEGF como DLL4, interfiere con las interacciones

del receptor VEGF/VEGF y con las interacciones DLL4/Notch, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a DLL4, y reduce la frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer.

La presente invención proporciona métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a agente de ligación a VEGF/DLL4 a un sujeto (por ejemplo, un sujeto en necesidad de tratamiento). En ciertas modalidades, el sujeto es un humano. En ciertas modalidades, el sujeto tiene un tumor canceroso. En ciertas modalidades, el sujeto ha tenido un tumor removido.

El cáncer/tumor del sujeto, puede, en algunas modalidades, ser refractario a ciertos tratamiento(s). Como un ejemplo no limitante, el cáncer del sujeto (o tumor) puede ser quimiorefractario. En ciertas modalidades, el cáncer del sujeto puede ser resistente a la terapia anti-VEGF o terapia anti-DLL4, o ambas.

En ciertas modalidades, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, glioblastoma, y cáncer de cabeza y

cuello. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de ovario. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer colorectal o cáncer de colon. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer pancreático. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de mama. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hematológico tal como leucemia o linfoma. En algunas modalidades, la leucemia o linfoma es una leucemia de células B o linfoma. En algunas modalidades, la leucemia o linfoma es una leucemia o linfoma de células T. En algunas modalidades, el cáncer hematológico es leucemia mielogenosa aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, leucemia de células capilares, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células T cutáneo, o leucemia linfoblástica aguda de células T.

La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en donde la enfermedad o trastorno se asocia con la angiogénesis. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno se asocia con angiogénesis aberrante. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno se asocia con angiogénesis incrementada. De esta manera, la presente invención proporciona métodos para modular la angiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva

de cualquiera de los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga al VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga al VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga al DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga al VEGF humano y DLL4 humano.

Se proporcionan adicionalmente métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en donde la enfermedad o trastorno se caracteriza por un nivel incrementado de células madre y/o células progenitoras. En algunas modalidades, os métodos de tratamiento comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4, polipéptido, o anticuerpo al sujeto.

En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un

segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente al DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2

de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y un segundo sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada

que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64, y una primera región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo

menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región

variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo anti-VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R79. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R75. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico

que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de litación a antígeno del anticuerpo 21M18. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

La presente invención proporciona además las composiciones farmacéuticas que comprende los agentes de ligación descrito en la presente. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento tumoral y/o para tratar el cáncer en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano).

En ciertas modalidades, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprende anticuerpos biespecíficos, en donde por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% de los anticuerpos en la composición son anticuerpos biespecíficos o anticuerpos heterodiméricos. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos IgG (por ejemplo, IgG2 o IgG1). En ciertas modalidades, menor que aproximadamente 10%, menor que aproximadamente 5%, menor que aproximadamente 2% o menor que aproximadamente 1% de los anticuerpos totales en las composiciones son anticuerpos monoespecíficos o anticuerpos homodiméricos. En ciertas modalidades, los anticuerpos en la composición por lo menos aproximadamente 98% heterodiméricos.

En ciertas modalidades, las formulaciones se preparan para almacenamiento y uso al combinar un anticuerpo o agente purificado de la presente invención con un vehículo

farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un portador o excipiente). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, soluciones amortiguadoras no tóxicas tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservadores tales como cloruro de amono de octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, fenol, butilo o alcohol bencílico, alquil-parabenos, tales como metil o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol; polipéptidos de peso molecular bajo (por ejemplo, menor que aproximadamente 10 residuos de aminoácido); proteínas tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; los aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tales como, sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal tal como complejos de proteína Zn; y surfactantes no iónicos tal como TWEEN o polietilenglicol (PEG). (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición*, 2005, University of the Sciences, Filadelfia, PA).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en cualquier variedad de formas para cualquier tratamiento local sistémico. La administración puede ser tópica por parches epidérmicos o transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, rocíos, líquidos, y polvos; pulmonar por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador, intra-traqueal, e intranasal; oral; o parenteral incluyendo intravenosa, intraarterial, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular (por ejemplo, inyección o infusión), o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en una forma de dosificación unitaria. Tales formulaciones incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios. En las composiciones sólidas tales como tabletas el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los ingredientes para la formación de tabletas convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y diluyentes (por ejemplo, agua). Estos se pueden usar para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica de

la misma. La composición de pre-formulación sólida luego se subdivide en formas de dosificación unitarias de un tipo descrito en lo anterior. Las tabletas, píldoras, etc., de la formulación o composición se pueden recubrir o de otra manera componer para proporcionar una forma de dosificación que permite la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente exterior. Adicionalmente, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o que se retarde en la liberación. Una variedad de materiales se puede usar para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen una variedad de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes o anticuerpos de ligación a VEGF/DLL4 o descritos en la presente también se pueden atrapar en microcápsulas. Tales microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de co-acervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y

nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *21ª Edición*, 2005, University of the Sciences en Filadelfia, PA.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas incluyen un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención formado en complejo con liposomas. Los métodos para producir liposomas son bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Por ejemplo, algunos liposomas se pueden generar por evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se pueden extruír a través de filtros de tamaño de poro definidos para producir liposomas con el diámetro deseado.

En ciertas modalidades, las preparaciones de liberación sostenidas se pueden producir. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), donde las matrices están en la forma de artículos formados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Ejemplos adicionales de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, tales como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilacturos, copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-

glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como LUPRON DEPOT^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), isobutirato de acetato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

En ciertas modalidades, además de administrar un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), el método o tratamiento comprende además administrar por lo menos un agente terapéutico adicional. Un agente terapéutico adicional se puede administrar antes de, concurrentemente con, y/o subsecuentemente a, la administración del agente de ligación a VEGF/DLL4. Las composiciones farmacéuticas que comprende un agente de ligación a VEGF/DLL4 y el agente(s) terapéutico adicional también se pueden proporcionar. En algunas modalidades, el por lo menos un agente terapéutico adicional comprende 1, 2, 3, o más agentes terapéuticos adicionales.

La terapia de combinación con por lo menos dos agentes terapéuticos usa frecuentemente agentes que trabajan por mecanismos de acción diferentes, aunque no se requiere. La terapia de combinación que usa agentes con diferentes mecanismos de acción puede dar por resultado efectos de aditivo o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que se use en la

monoterapia, reduciendo de esta manera los efectos secundarios tóxicos y/o incrementando el índice terapéutico de por lo menos uno de los agentes. La terapia de combinación puede disminuir la probabilidad de que las células cancerosas resistentes se desarrollen. En algunas modalidades, la terapia de combinación comprende un agente terapéutico que afecta principalmente (por ejemplo, inhibe o extermina) células no tumorigénicas y un agente terapéutico que afecta principalmente (por ejemplo, inhibe o extermina) CSCs tumorigénicos.

Las clases útiles de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina, auristatinas, aglutinantes de la hendidura menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes de alquilación (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatina, mono(platino), bis(platino) complejos de platina tri-nucleares y carboplatina), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sintetizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etoposidos, pirimidinas fluoradas, ionoforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, antimetabolitos de purina, puromicinas, sintetizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca, o similares. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente de alquilación, un anti-metabolito, un antimitótico, un inhibidor de topoisomerasa o un inhibidor de angiogénesis.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un complejo de platino tal como carboplatina o cisplatina. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un complejo de platino en combinación con un taxano.

Los agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con los agentes de ligación a VEGF/DLL4 incluyen agentes quimioterapéuticos. De esta manera, en algunas modalidades, el método o tratamiento implica la administración de un agente o anticuerpo de ligación a anti-VEGF de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. En algunas modalidades, el método o tratamiento implica la administración de un agente o anticuerpo de ligación a anti-DLL4 de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. En algunas modalidades, el método o tratamiento implica la administración de un anticuerpo biespecífico de la presente invención que se liga a VEGF y DLL4, en combinación con un agente quimioterapéutico o coctel de múltiples agente quimioterapéuticos diferentes.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes de alquilación tal como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo tal como busulfan, improsulfan y

piposulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosfaoramida y trimetilolomelamima; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, cloARNfazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicin, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-

azauridina, carmofor, arabinosida de citosina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostana, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedores de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK; razoxana; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido (Ara-C); taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL) y docetaxel (TAXOTERE); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico;

esperamicinas; capecitabina (XELODA); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazolos inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es cisplatina. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es carboplatina. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es paclitaxel.

En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos que interfieren con la acción de una enzima de topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina HCl, citrato de daunorubicina, mitoxantrona HCl, actinomicina D, etopósido, topotecano HCl, tenipósido (VM-26), e irinotecano, así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de

cualquiera de estos. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es irinotecano.

En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un anti-metabolito. Un anti-metabolito es un químico con una estructura que es similar a un metabolito requerido para las reacciones bioquímicas normales, todavía suficientemente diferente para interferir con una o más de las funciones normales de las células, tal como la división celular. Los anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato sódico, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinosido, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina, y cladribina, así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de cualquiera de estos. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es gemcitabina.

En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un agente antimitótico, incluyendo, pero no limitado a, agentes que se ligan a la tubulina. En algunas modalidades, el agente es un taxano. En ciertas modalidades, el agente es paclitaxel o docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable, ácido, o derivado de paclitaxel o docetaxel. En ciertas modalidades, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel ligado a albúmina (ABRAXANE), DHA-paclitaxel, o PG-paclitaxel. En ciertas

modalidades alternativas, el agente antimitótico comprende un alcaloide de la vinca, tal como vincristina, vinblastina, vinorelbina, o vindesina, o sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de los mismos. En algunas modalidades, el agente antimitótico es un inhibidor de quinesina Eg5 o un inhibidor de una cinasa mitótica tal como Aurora A o Plk1. En ciertas modalidades, donde el agente quimioterapéutico administrado en combinación con un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente antimitótico, el cáncer o tumor que se trata es cáncer de mama o un tumor de mama.

En algunas modalidades, un segundo agente terapéutico comprende un agente tal como una molécula pequeña. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo un anticuerpo) de la presente invención con una molécula pequeña que actúa como un inhibidor contra las proteínas asociadas a tumor adicionales incluyendo, pero no limitado a, EGFR, ErbB2, HER2, y/o VEGF. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de la trayectoria Notch. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de la molécula pequeña de la ruta Wnt. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de la

ruta BMP. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña que inhibe la señalización de β-catenina.

En algunas modalidades, un segundo agente terapéutico comprende una molécula biológica, tal como un anticuerpo. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de n agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo un anticuerpo) de la presente invención con otros anticuerpos contra proteínas asociadas a tumor adicionales que incluyen, pero no limitado a, anticuerpos que se ligan a EGFR, ErbB2, HER2, y/o VEGF. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un anticuerpo marcador de células madre anti-cancerosas. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se liga a un componente de la trayectoria Notch. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se liga a un componente de la ruta Wnt. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la trayectoria Notch. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la ruta Wnt. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la ruta BMP. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo

que inhibe la señalización de β-catenina. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un inhibidor o modulador de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo receptor anti-VEGF o VEGF). En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX), o cetuximab (ERBITUX). La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una formulación farmacéuticamente individual o usando formulaciones separadas, o a la administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.

Adicionalmente, el tratamiento con un agente de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente puede incluir tratamiento de combinación con otras moléculas biológicas, tal como una o más citocinas (por ejemplo, linfocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral, y/o factores de crecimiento) o se pueden acompañar por la remoción quirúrgica de tumores, células cancerosas, o cualquier otra terapia evaluada necesaria por un médico tratante.

En ciertas modalidades, el tratamiento implica la administración de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo un anticuerpo) de la presente invención en combinación con terapia de radiación. El tratamiento con un

agente de ligación a VEGF/DLL4 puede presentarse antes, concurrentemente con, o subsecuente a la administración de la terapia de radiación. Los programas de dosificación para tal terapia de radiación se pueden determinar por el profesional médico experto.

Se apreciará que la combinación de un agente de ligación a VEGF/DLL4 y un agente terapéutico adicional se puede administra en cualquier orden o concurrentemente. El tratamiento con un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se puede presentar antes, concurrentemente con, o subsecuente a la administración de las quimioterapias. La administración combinada puede incluir co-administración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o usando formulaciones separadas, co-administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine empíricamente por el profesional experto. Los programas de preparación y dosificación para tal quimioterapia también se describen en *The Chemotherapy Source Book, 4ª Edición*, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará a pacientes que se han sometido previamente al tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 y un segundo agente terapéutico se administrarán sustancialmente de manera simultánea o concurrentemente. Por ejemplo, un sujeto se le puede administrar un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) mientras que se somete a un curso de tratamiento con un segundo agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia). En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 1 año del tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades alternativas, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 10, 8, 6, 4, o 2 meses de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 4, 3, 2, o 1 semanas de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 5, 4, 3, 2, o 1 días de cualquiera tratamiento con un segundo agente terapéutico. Se apreciará adicionalmente que los dos (o más) agentes o tratamientos se pueden administrar al sujeto dentro de una cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente de manera simultánea).

Para el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención depende del tipo de enfermedad que se trata, la gravedad y curso de la enfermedad, la sensibilidad de la enfermedad, si el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, el historial clínico del paciente, y así sucesivamente, todo en la discreción del médico que trata. El agente o anticuerpo de ligación a VEGF/DLL4 se puede administrar una vez o como una serie de tratamientos separados durante varios días a varios meses, o hasta que se lleve a cabo una cura o se logre una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y vararán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o agente individual. El médico que administra puede determinar las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación, y velocidades de repetición. En ciertas modalidades, la dosificación de un agente o anticuerpo de ligación a VEGF/DLL4 es de aproximadamente 0.01µg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0.1µg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1µg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1mg a

aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1mg a aproximadamente 80mg/kg de peso corporal de aproximadamente 10mg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10mg a aproximadamente 75mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 10mg a aproximadamente 50mg/kg de peso corporal. En ciertas modalidades, la dosificación del anticuerpo u otro agente de ligación a VEGF/DLL4 es de aproximadamente 0.1mg a aproximadamente 20mg/kg de peso corporal. En ciertas modalidades, la dosificación se puede administrar una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente, o al año. En ciertas modalidades, el anticuerpo u otro agente de ligación a VEGF/DLL4 se administra una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada mes.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se puede administrar en una dosis de “carga” más alta inicial, seguido por una o más dosis más bajas. En algunas modalidades, la frecuencia de administración también puede cambiar. En algunas modalidades, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis inicial, seguido por dosis adicionales (o dosis “de mantenimiento”) una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez cada mes. Por ejemplo, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguido por una dosis

de mantenimiento semana de, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguido por dosis de mantenimiento de, por ejemplo la mitad de la dosis inicial cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender administrar tres dosis iniciales durante 3 semanas, seguido por dosis de mantenimiento de, por ejemplo, la misma cantidad cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis inicial seguido por dosis adicionales cada 3 semanas o una vez al mes. El médico que trata puede estimar las velocidades de repetición para la dosificación basado en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. El progreso de la terapia se puede supervisar por técnicas y ensayos convencionales.

Como es conocido por aquellas personas de experiencia en el campo, la administración de cualquier agente terapéutico puede conducir a efectos secundarios y/o toxicidades. En algunos casos, los efectos secundarios y/o toxicidades son tan graves como para impedir la administración del agente particular en una dosis terapéuticamente efectiva. En algunos casos, la terapia de fármacos se debe descontinuar, y se pueden probar otros agentes. Sin embargo, muchos agentes en la misma clase terapéutica muestran frecuentemente efectos secundarios y/o toxicidades similares, lo que significa que

el paciente tiene que detener ya sea la terapia, o si es posible, sufrir de los efectos secundarios desagradables asociados con el agente terapéutico.

Los efectos secundarios de los agentes terapéuticos pueden incluir, pero no se limitan a, urticaria, sarpullido, comezón, nausea, vomito, apetito disminuido, diarrea, escalofríos, fiebre, fatiga, molestias musculares y dolor, dolores de cabeza, presión arterial baja, presión arterial alta, hipocalemia, recuentos sanguíneos bajos, sangrado, y problemas cardiacos.

De esta manera, un aspecto de la presente invención se dirige a métodos para tratar cáncer en un paciente que comprende administrar un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente, que puede reducir los efectos secundarios y/o toxicidad asociadas con la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. Como se usa en la presente, “dosificación intermitente” se refiere a un régimen de dosificación que usa un intervalo de dosificación de más de una vez a la semana, por ejemplo, dosificación de una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, etc. En algunas modalidades, un método para tratar cáncer en un paciente humano comprende administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de acuerdo con un régimen de dosificación

intermitente. En algunas modalidades, un método para tratar cáncer en un paciente humano comprende administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente, e incrementar el índice terapéutico del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 a aproximadamente una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes de anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 a aproximadamente una vez cada 3 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 aproximadamente una vez cada 4 semanas.

En algunas modalidades, la dosis subsecuente en un régimen de dosificación intermitente son aproximadamente la misma cantidad o menor que la dosis inicial. En otras modalidades, la dosis subsecuente es una cantidad mayor que

la dosis inicial. Como es sabido por aquellas personas de experiencia en el campo, las dosis usadas variaran dependiendo de los objetivos clínicos que se logren. En algunas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 0.25mg/kg a aproximadamente 20mg/kg. En algunas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 0.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 1mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 2.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 7.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 10mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 12.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 15mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 20mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0.25mg/kg a aproximadamente 15mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0.5mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son

de aproximadamente 1mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 2.5mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 5mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 7.5mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 10mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 12.5mg/kg.

En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2.5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2.5 mg/kg una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2.5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2.5 mg/kg una vez cada 3 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de

un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 3 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2.5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2.5 mg/kg una vez cada 4 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 4 semanas. En ciertas modalidades, la dosis inicial y la dosis de mantenimiento son diferentes, por ejemplo, la dosis inicial es de aproximadamente 5mg/kg y la dosis subsecuente son de aproximadamente 2.5mg/kg. En ciertas modalidades, un régimen de dosificación intermitente puede comprender una dosis de carga, la dosis inicial es de aproximadamente 20mg/kg y las dosis subsecuentes son de aproximadamente 2.5mg/kg o aproximadamente 5mg/kg administradas una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez cada 4 semanas.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para reducir la toxicidad de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en un paciente humano que

comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente. Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para reducir los efectos secundarios de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en un paciente humano que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente. Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para incrementar el índice terapéutico de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de un paciente humano que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente.

La elección del método de administración para la dosis iniciales y subsecuentes se hace de acuerdo con la capacidad del paciente animal o humano de tolerar la introducción del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en el cuerpo. De esta manera, en cualquiera de los aspectos y/o modalidades descritas en la presente, la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 puede ser mediante inyección intravenosa o intravenosamente. En algunas modalidades, la administración es por infusión intravenosa. En cualquiera de los aspectos y/o modalidades descritas en la presente, la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 puede ser por una vía no intravenosa.

V. Kits que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4

La presente invención proporciona kits que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpos) descritos en la presente y que se pueden usar para llevar a cabo los métodos descritos en la presente. En ciertas modalidades, un kit comprende por lo menos un anticuerpo purificado contra VEGF y/o DLL4 en uno o más contenedores. En algunas modalidades, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para llevar a cabo un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, indicaciones para llevar a cabo los ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de los resultados. Una persona experta en el campo reconocerá fácilmente que los agentes de ligación a VEGF/DLL4 dados a conocer de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en el campo.

Se proporcionan además kits que comprenden un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4), así como por lo menos un agente terapéutico adicional. En ciertas modalidades, el segundo (o más) agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. En ciertas modalidades, el segundo (o más) agente terapéutico es un inhibidor de angiogénesis.

Modalidades de la presente descripción se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se describen en preparación detallad en ciertas modalidades de la presente descripción y métodos para usar los anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para aquellas personas expertas en el campo que muchas modificaciones, tanto materiales como métodos, se pueden practicar sin apartarse del alcance de la presente descripción.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Afinidades de ligación de los anticuerpos anti-VEGF/anti-DLL4

Las K_Ds de los anticuerpos parenterales anti-VEGF 219R45 (formato IgG), anti-DLL4 21R79 (formato IgG), anti-DLL4 21M18 (formato IgG) y anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se determinaron usando un sistema Biacore 2000 de Biacore LifeSciences (GE Healthcare). Proteínas de DLL4-Fc humanas o DLL4-Fc de ratón recombinantes se inmovilizaron sobre chips de carboxilo CM5 usando química basada en amina estándar (NHS/EDC) y se bloquearon con etanolamina. La $VEGF_{165}$ humana o $VEGF_{165}$ de ratón recombinantes se biotinilaron y se inmovilizaron sobre chips de estreptavidina. Los anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de 100nM a 0.78nM en HBS-P (HEPES 0.01M pH7.4, NaCl 0.15M, 0.005% v/v de Polisorbato 20). Para cada anticuerpo, las 8

diluciones se inyectaron secuencialmente sobre un chip específico. Los datos cinéticos se recolectaron a través del tiempo y se ajustaron usando ecuación de ajuste global simultáneo para producir constantes de afinidad (valores K_D) para cada anticuerpo biespecífico.

Tabla 3

Anticuerpo	hVEGF (nM)	mVEGF(nM)	hDLL4 (nM)	mDLL4 (nM)
219R45	0.67	22.9	NB	NB
21M18	NB	NB	<0.1	NB
21R79	NB	NB	<0.1	NB
219R45-MB-21M18	0.36	25.5	16	NB
219R45-MB-21R79	0.68	12.5	0.53	NB

Como se muestra en la Tabla 3, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tuvo una constante de afinidad (K_D) para el VEGF humano de 0.36nM y una K_D para el DLL4 humano de 16nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tuvo una K_D para el VEGF humano de 0.68nM y una K_D para el DLL4 humano de 0.53nM. Ambos anticuerpos biespecíficos mostraron ligación más débil al VEGF de ratón como es comparado con el VEGF humano y ningún anticuerpo se ligó al DLL4 de ratón. De esta manera, ambos anticuerpos biespecíficos mostraron afinidad de ligación similar al VEGF

humano y 219R45-MB-21R79 mostró aproximadamente una ligación 30 veces más potente al DLL4 humano que el 219R45-MB-21M18. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tuvo una afinidad de ligación similar a VEGF humano a pesar del hecho de que el anticuerpo biespecífico es monovalente para VEGF como es comparado con el anticuerpo parenteral bivalente.

Se identificaron varios anticuerpos anti-DLL4 adicionales que tuvieron afinidades de ligación intermedias con las K_Ds de 21M18 y 21R79. Dos de estos anticuerpos anti-DLL4 se usaron para producir anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R75 y 219R45-MB-21R83. Usando el sistema Biacore 2000 como se describe en lo anterior, las K_Ds de los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21R75 y 219R45-MB-21R83 al de DLL4 humano se determinaron. Una comparación de la afinidad de ligación al DLL4 humano de estos cuatro anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se muestra en la Tabla 4.

Las CDRs para los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se muestran en la Figura 1A. La región variable de cadena pesada y cadena ligerea SEQ ID NOs se muestran en la Figura 1B y la SEQ ID Nos de cadena pesada y cadena ligera (con o sin secuencia señal) como se muestra en la Figura 1C.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 comprende una (a) cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:75 depositado con American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, EUA, bajo las condiciones del Tratado de Budapest del 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositado con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest del 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositado con el ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre de 2012, y se le asignó el número de designación PTA__.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:31 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__, y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21

de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__.

En anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 y 219R45-MB-21R83 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:72 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el__ y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, e (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación en PTA__.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R75 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:74 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__ y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21

de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__.

Tabla 4

Anticuerpo	CDR2 de cadena pesada	hDLL4 (nM)
219R45-MB-21M18	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	16.00
219R45-MB-21R79	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	0.53
219R45-MB-21R75	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	5.10
219R45-MB-21R83	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	1.30

Ejemplo 2

Ensayo HTRF para la ligación simultánea de anticuerpos biespecíficos a VEGF humano y DLL4 humano.

Para caracterizar las capacidades de ligación de ciertos anticuerpos y/o mezcla de anticuerpos a tanto VEGF como DLL4, se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia resueltos en el tiempo homogéneo (HTRF). Los anticuerpos sometidos a prueba fueron los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, los anticuerpos parenterales 219R45 (anti-VEGF), 21M18 (anti-DLL4), 21R79 (anti-DLL4), una combinación de 219R45 y 21M18, una combinación de 219R45 y 21R79. Los anticuerpos o mezclas de anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de

3000nM a 2.9nM en solución amortiguadora de ligación (1X de PBS, 0.1% de gelatina, 0.1% Polisorbato 20, fluoruro de potasio 400mM) y se colocaron en una placa de 96 pocillos blancos. Un volumen igual de solución que contiene 4µg/ml de hDLL4-Fc etiquetado con d2 y 21.4ng/ml de $hVEGF_{165}$ etiquetado con tripato de Europio se agregaron a cada pocillo para un volumen final de 100µl (concentraciones finales de fluoróforo aceptores y donadores fueron de 2µg/ml y 10.7ng/ml, respectivamente). Las placas de ensayo se incubaron durante 2 horas durante la noche y se leyeron sobre un lector de Micro placas SpectraMax M5e (Molecular Devices, Sunnyvale CA) en una longitud de onda de excitación de 314nm.

Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, fueron capaz de ligarse tanto a hVEGF como a hDLL4 simultáneamente. De manera importante, ninguna de las combinaciones de los anticuerpos parenterales (es decir, 219R45 y 21M18 o 219R45 y 21R79) fueron capaces de ligarse a VEGF y DLL4 simultáneamente. Estos resultados muestran claramente que los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 son capaces de funcionar de manera diferente que una simple mezcla de los dos anticuerpos individuales.

Ejemplo 3

Inhibición de la proliferación de HUVEC por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4

Células HUVEC se obtuvieron de Lonza (Walkersville MD) y se cultivaron en un medio de crecimiento (M199, 10% de FBS inactivado por calor (HI-FBS), 50µg/ml de EGS, 1X de heparina, L-glutamina 1mM). Para de proliferación de HUVEC, una placa de 96 pocillos se pre-recubrió con 50µl de 10µg/ml de solución tipo I de colágeno de cola de rata (colágeno I en ácido acético 0.02N) y se incubó a 4°C durante la noche. Después de la incubación, la palca se aspiró completamente para remover la solución de colágeno I no ligada y se lavó una vez con 200µl de DPBS. Las células HUVEC se removieron de la superficie de los matraces de crecimiento usando un reactivo sub-clon de células endoteliales y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se volvieron a suspender en un medio de inanición/ensayo (M199 y 2% de HI-FBS, 1X de heparina, 5U/ml heparina-glutamina) en una densidad de 10^5 células/ml. Las células se sembraron en una placa de ensayo recubierta con colágeno a 5000 células/pocillo, 50ul/pocillo. Las células se incubaron durante 3 horas a 37°C, se lavaron una vez, se volvieron a alimentar con 100ul de medio de ensayo, y se incubaron durante la noche a 37°C. Al siguiente día, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, en anticuerpo parenteral 219R45, o el anticuerpo de control LZ1 se

prepararon en una mezcla con VEGF humano (R&D Biosystems, Minneapolis MN). Los anticuerpos se diluyeron en serie 5 veces de 20µM a 0.25nM en solución amortiguadora de ensayo en combinación con hVEGF (concentración final 5ng/ml). La mezcla se pre-incubó a 37°C durante 2 horas. El medio se removió de la placa de ensayo, y 100µl de la mezcla de anticuerpo/hVEGF se agregó a cada pocillo. Después de 3-4 días de incubación, el medio se removió y una alícuota reciente de la mezcla de anticuerpo/hVEGF se agregó a cada pocillo y se dejó incubar durante otros 4 días. En el día 7, 20µl de reactivo Azul Alamar (Invitrogen, Carlsbad, CA) se agregó a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 5-6 horas. La placa se leyó con un lector de Micro placas SpectraMax M5e (Molecular Devices, Sunnyvale CA) usando una longitud de onda de excitación de 539nm y una longitud de onda de emisión de 590nm.

Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, así como el anticuerpo anti-VEGF parenteral 219R45 mostraron proliferación de HUVEC. Estos resultados muestran que los anticuerpos biespecíficos fueron capaces de inhibir la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC.

Ejemplo 4

Inhibición de la señalización Notch inducida por DLL4 por anticuerpos específicos.

Células PC3 humanas se transfectaron con un vector de

expresión que codifica un receptor Notch2 humano de longitud completa y un vector reportero de luciferasa de luciérnaga (reportero 8xCBF-luciferasa) que es responsable de la señalización Notch. Las células también se transfectaron con un reportero de luciferasa Renilla (Promega, Madison WI) como un control interno para la eficiencia de la transfección. La proteína DLL4 humana purificada se recubrió sobre placas de 96 pocillos a 100ng/pocillo y las células PC3-luc que expresan Notch2 se agregaron a los pocillos. Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, anticuerpos anti-DLL4 parenterales 21M18, 21R79 o un anticuerpo de control LZ1 se diluyeron en serie 5 veces de 20ug/ml a 0.064ug/ml, se agregaron a los pocillos apropiados, y se incubaron durante la noche. La actividad de la luciferasa se determinó usando un kit de ensayo de luciferasa doble (Promega, Madison, WI) con actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada con la actividad de luciferasa Renilla.

Como se muestra en la Figura 4, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 y los anticuerpos anti-DLL4 parenterales 21M18 y 21R79 inhibieron la señalización Notch inducida por DLL4. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 inhibió la señalización Notch inducida por DLL4 solamente en consideraciones de anticuerpo altas. Estos resultados mostraron que el anticuerpo

biespecífico anticuerpo 219R45-MB-21R79, y a un grado menor del anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18, fueron capaces de inhibir la señalización Notch inducida por DLL4. De esta manera, en combinación con los resultados presentados en el Ejemplo 3, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 y 219R45-MB-21M18, habían mostrado la capacidad de inhibir las funciones de señalización y/o proliferación inducidas tanto por VEGF como de DLL4.

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por un anticuerpo biespecífico en un modelo de injerto de piel humana.

Un modelo de injerto de piel humana se ha reportado que comprende un injerto de piel humana y células tumorales humanas. Se establece un injerto de piel humana y luego las células tumorales humanas se implantan en el injerto de piel, permitiendo que las células tumorales se desarrollen en un entorno con estroma y vasculatura humana (Tahtis y colaboradores, 2003, Mol. Cancer Ther. 2:229-737). Las muestras de piel humana se obtuvieron de tejido de prepucio neonatal y se injertó en el flanco lateral de ratones NOD-SCID. Después del establecimiento del injerto de piel, células tumorales de colon OMP-C8 etiquetadas con luciferasa (20,000 células) se inyectaron intradérmicamente en la piel humana. El crecimiento tumoral se supervisó por formación de imágenes de bioluminiscencia usando un sistema de formación

de imágenes IVIS (Caliper Life Sciences, Mountain View, CA). Los tumores se dejaron desarrollar hasta que alcanzaron 1.2 x 10^6 fotones por segundo. Los ratones que llevan tumor (n = 6 ratones/grupo) se eligieron al azar y se trataron con Ab de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab, o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18. Los animales se trataron una vez a la semana y los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 25mg/kg. El crecimiento tumoral se supervisó por formación de imágenes de bioluminiscencia en los días indicados.

Como se muestra en la Figura 5, tanto el anticuerpo anti-hDLL4 21M18 como el anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab inhibieron el crecimiento tumoral en este modelo de injerto de piel humana/tumor humano. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 fue más efectivo que ya sea el anticuerpo anti-DLL4 o el anticuerpo anti-VEGF solo. Estos datos muestran la utilidad fijar como objetivo simultáneamente el DLL4 y VEGF con un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 6

Tumorigenicidad de células tumorales pancreáticas OMP-PN8 después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4.

Ratones que llevan tumores pancreáticos OMP-PN8 se

trataron con anticuerpo de control (15 mg/kg), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (15 mg/kg), anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab (15 mg/kg), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 (30 mg/kg) con o sin gemcitabina (70 mg/kg). Después de cuatro semanas de tratamiento, los tumores se recolectaron, se procesaron a suspensiones de células individuales y las células tumorales humanas se purificaron por agotamiento inmunomagnético de células de murino. 90 células tumorales humanas de cada grupo del tratamiento se transfirieron a un nuevo cohorte de ratones (n = 10 ratones/grupo). Los tumores se dejaron desarrollar durante 55 días sin ningún tratamiento y los volúmenes del tumor se midieron con calibradores electrónicos.

La Figura 6 muestra el volumen de tumor de los ratones individuales en cada grupo. Las células aisladas de ratones tratados con anticuerpo anti-hDLL4 21M18 tuvieron un tumorigenicidad disminuida en gran medida, 5 de 10 ratones tuvieron tumores, como es comparada con las células aisladas de ratones tratados con el anticuerpo de control donde 9 de 10 ratones tuvieron tumores. La reducción en la frecuencia del crecimiento tumoral indica una reducción en la frecuencia de células madre cancerosas. En contraste, el tratamiento con bevacizumab no dio por resultado reducción de la frecuencia del crecimiento tumoral, 10 de 10 ratones tuvieron tumores. Similar al bevacizumab, el tratamiento con gemcitabina como un solo

agente no tuvieron efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral ya que 10 de 10 ratones tuvieron tumores. Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 ambos redujeron la frecuencia del crecimiento tumoral (5 de 10 ratones tuvieron tumores y 4 de 10 ratones tuvieron tumores, respectivamente). El tratamiento de combinación con gemcitabina pareció que no tiene efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral. Estos datos indican que el DLL4 objetivo reduce la frecuencia de células madre cancerosas mientras que el VEGF objetivo solo no lo hace. De manera importante, estos datos indican que la actividad anti-CSC del anticuerpo anti-DLL4 se retiene en un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 7

ELISA de Anticuerpo Biespecífico

El VEGF (ATGEN, Corea del Sur) se recubrió sobre placas Nunc maxisorb a 2ug/ml (100µl/pocillo) y se incubó durante la noche a 2-8°C. Los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo (1x de PBS, 0.1% de gelatina 0.1% de Polisorbato-20, pH 7.4) que contiene 2µg/ml de biotina-DLL4-hFc. Los anticuerpos se diluyeron en serie 3 veces de 500ng/ml a 0.008ng/ml. Las muestras de anticuerpo se incubaron durante 2 horas en solución amortiguadora de bloqueo que contiene la biotina-DLL4-hFc. Después de la incubación, las muestras de anticuerpo se

transfirieron a la placa de ensayo recubierta con VEGF (100 ul/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se agregó a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. El substrato TMB se agregó a los pocillos con un desarrollo de color de 10 minutos y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se leyó a 450-650nm y los datos se analizaron usando el ajuste de 4 parámetros dentro del programa de análisis Softmax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

La Figura 7 muestra las curvas de titulación de los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 (círculos abiertos), 219R45-MB-21R79 (cuadrados abiertos), 219R45-MB-21R75 (triángulos abiertos), y 219R45-MB-21R83 (triángulos abiertos) en comparación con un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de referencia (círculos sólidos). Las potencias relativas para los anticuerpos biespecíficos como es comparado con el anticuerpo biespecífico de referencia se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Anticuerpo	Potencia Relativa (%)
219R45-MB-21M18	67
219R45-MB-21R79	501
219R45-MB-21R75	422
219R45-MB-21R83	222

El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 que el más potente, aproximadamente 7 veces más potente que 219R45-MB-21M18, que reflejó la afinidad más alta del sitio de ligación a antígeno 21R79.

Ejemplo 8

Producción de Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos se produjeron usando una línea de células GS-CHO. Las células CHOK1SV (Lonza Biologics) se transfectaron a través de electroporación con el gen(s) de interés acoplado con glutamina sintetasa (GS) como el marcador seleccionable. Los transfectantes y subclones se clasificaron para la productividad de anticuerpos y los productores altos se seleccionaron para la producción de mayor escala. Las células se desarrollaron usando un proceso de lote de alimentación y bioreactores de lote de alimentación. El anticuerpo acumulado en el fluido de cultivo de células recolectadas (HCCF) se aisló y se purificó usando técnicas de cromatografía.

Líneas de células de anticuerpo biespecíficos 219R45-MB-21M18.010.017 y 219R45-MB-21R79.017.003 se cultivaron en bioreactores de tanque agitados de 5L durante 14 días. Las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017 produjeron un título de anticuerpo final de 3.0g/L y la línea de células 219R45-MB-21R79.017.003 produjo un título de anticuerpo final de 0.8g/L. Las líneas de células 219R45-MB-21R75.101 y

219R45-MB-21R83.113 se cultivaron en sistemas de bioreactor WAVE de 25L (GE Healthcare) usando un proceso de lote de alimentación que logró títulos de anticuerpo finales de 0.4g/L. Las líneas de células de anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18AG.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014 y 219R45-MB-21R83AG.129.003 se cultivaron en bioreactores de tanque de agitado de 5 L durante 14 - 15 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.138.007 produjo un título de anticuerpo final de 1.0 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.038.009 produjo un título de anticuerpo final de 1.6 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.142.002 produjo un título de anticuerpo final de 2.6 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21R79AG.072.014 produjo un título de anticuerpo final de 2.1 g/L después de 15 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.038.009 produjo un título de anticuerpo final de 2.4 g/L después de 15 días. El fluido de cultivo se recolectó por filtración de cada una de estas cuatro líneas de células y se sometió a la cromatografía de afinidad de proteína A. La columna de proteína A se lavó con una serie de soluciones amortiguadoras y los anticuerpos se eluyeron usando una solución amortiguadora de elución con pH bajo. La caracterización inicial de la pureza de los anticuerpos biespecíficos se llevó a cabo usando cromatografía de

exclusión de tamaño (SEC-HPLC) y en foque isoeléctrico (IEF).

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se usó para determinar la pureza del producto de anticuerpo. La SEC es un método cromatográfico bien conocido en el cual las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) en solución se separan por su tamaño. La SEC se puede usar para distinguir un producto de anticuerpo de agregado y/o impurezas, y para determinar el porcentaje del producto de anticuerpo como es comparado con la mezcla total. Como se usa en la presente, la SEC no distingue entre un anticuerpo homomérico y un anticuerpo biespecífico heterodimérico.

El enfoque isoeléctrico capilar de imagen (icIEF) se usó para determinar la identidad y pureza de los heterodímeros de anticuerpo biespecífico. Usando el icIEF, las isoformas de carga del anticuerpo se separan de acuerdo con su pI y el resultado es una “huella” de la distribución de carga del anticuerpo. El método icIEF también puede servir como una determinación de pureza al separar los heterodímeros de anticuerpo biespecífico por su pI distinta de cualquiera de los productos o impurezas de homodímeros.

Las muestras de anticuerpo biespecíficos se analizaron por icIEF en un instrumento ProteinSimple ICE280 (ProteinSimple, Santa Clara, CA). Para este análisis, una mezcla de proteínas se introduce en un capilar, se aplica voltaje alto a través del capilar y los anfolitos establecen

un gradiente de pH lineal a lo largo de la longitud del capilar. Bajo la influencia del campo eléctrico, los marcadores de pI y la mezcla de protección ambos migran la longitud del capilar hasta que se alcanza un valor de pH donde la carga neta es cero. Una vez enfocado, el instrumento ICE280 usa una detección de formación de imágenes de columna completa con una cámara UV de 280-nm para supervisar el patrón de las isoformas de proteína dentro del capilar. El electroferograma resultante se calibra usando marcadores de pI internos y se integra para establecer el porcentaje de área respectivas de las isoformas cargadas diferentes de la mezcla de proteínas. Los perfiles de carga de varios anticuerpos específicos anti-VEGF/anti-DLL4 se muestran en la Figura 8. Para este experimento, se diluyeron eluatos de Proteína A con agua MilliQ a una concentración de 6.6mg/ml. Un total de 18µl de la muestra se mezclaron con 100µL de 8M urea, 70µl de 0.5% de metilcelulosa, 8µL de 3-10 Pharmalyte, 2µl de marcador de pI alto y 2µl de marcador de pI bajo a un volumen final de 200µl. La Tabla 6 muestra el porcentaje del producto de anticuerpo de las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, y 219R45-MB-21R83AG.129.003 después de la cromatografía de afinidad de Proteína A como es determinado

por SEC-HPLC. La Tabla 6 también muestra el porcentaje de los anticuerpos heterodiméricos de las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, y 219R45-MB-21R83AG.129.003 después de la cromatografía de afinidad de Proteína A como es analizado por icIEF.

Tabla 6

Línea de células	Titulación del Anticuerpo (g/L)	Pureza por SEC (%)	Pureza por IEF (% de heterodímero)
219R45-MB-21M18.010.017	3.0	73.9	47.2
219R45-MB-21R79.017.002	0.8	79.3	72.5
219R45-MB-21R75.101	0.4	91.2	84.9
219R45-MB-21R83.113	0.4	91.8	91.4
219R45-MB-21M18.138.007	1.0	92.6	95.8
219R45-MB-21M18AG.038.009	1.6	89.6	89.0
219R45-MB-21M18AG.142.002	2.6	91.2	84.6
219R45-MB-21R79AG.072.014	2.1	87.8	84.9
219R45-MB-21R83AG.129.003	2.4	89.4	90.5

La pureza del producto de anticuerpo biespecífico se puede incrementar adicionalmente por etapas de cromatografía adicionales. Después de la cromatografía de afinidad de Proteína A, la fracción de eluato se mantuvo en un pH bajo por no menos de 60 minutos a temperatura ambiente para la inactivación viral. La solución de anticuerpos (eluato de columna de Proteína A, pH ajustado) se cargó sobre una columna de intercambio aniónico potente. Las impurezas relacionadas con el producto y proceso ligadas a la resina de cromatografía de intercambio aniónico y a la fracción de flujo pasante (producto de anticuerpo) se recolectó. En algunos casos, la pureza se mejoró adicionalmente mediante el uso de una resina de cromatografía multimodal tal como hidroxiapatita de cerámica. En algunos casos, el intercambio de solución amortiguadora del producto de anticuerpo se llevó a cabo usando técnicas de ultrafiltración y diafiltración, después de lo cual los excipientes se agregaron. El anticuerpo formulado se filtró estéril en contenedores estériles y se almacenó refrigerado o congelado. La pureza de los anticuerpos biespecíficos se volvió a evaluar usando SEC-HPLC y IEF.

Tabla 7

Línea de células	Pureza por SEC (%)	Pureza por IEF (% de heterodímero)
219R45-MB-21M18.010.017	98.9	98.5
219R45-MB-21R79.017.002	95.1	99.3
219R45-MB-21R75.101	97.2	98.2
219R45-MB-21R83.113	95.3	91.4
219R45-MB-21M18.138.007	98.1	100
219R45-MB-21M18AG.142.002	99.6	100
219R45-MB-21R79AG.072.014	98.2	100
219R45-MB-21R83AG.129.003	998.6	100

Como se muestra en la Tabla 7, la purificación de los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 con etapas de cromatografía adicional después de la Proteína A dio por resultado el aislamiento de los productos de anticuerpo que fueron 95% a aproximadamente 99% puros como es analizado por SEC. El análisis por IEF determinó que el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 purificado de la línea de células 219R45-MB-21M18.010.017 fue de 98.5% heterodimérico,

el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R79.017.002 fue 99.3% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R75.101 fue 98.2% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R83.113 fue 91.4% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21M18.138.007 fue 100% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21M18AG.142.002 fue 100% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R79AG.072.014 fue 100% heterodimérico, y el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R83AG.129.003 fue 100% heterodimérico. Estos resultados mostraron que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico incrementó en gran medida el porcentaje de anticuerpos heterodiméricos como es comparado con la purificación con la cromatografía de Proteína A sola. La adición de una etapa de cromatografía multi-modal tal como hidroxiapatita de cerámica también puede mejorar la pureza monomérica (como es determinado por SEP-HPLC).

Ejemplo 9

Inhibición del crecimiento tumoral de colon OMP-C8 en el modelo de recurrencia de tumor *in vivo*

Suspensiones de células individuales de xenoinjertos de

tumor de colon OMP-C8 (20,000 células) se inyectaron cutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 240mm^3. Los ratones se eligieron al azar (n = 10 por grupo) y se trataron con anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, una combinación de anticuerpos 21M18 y bevacizumab, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79, o el anticuerpo de control, todos en combinación con irinotecano. Los anticuerpos y el irinotecano se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se dosificaron a 7.5mg/kg, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se dosificaron a 15mg/kg, y el irinotecano se dosificó a 45mg/kg. El irinotecano se dosificó durante cuatro semanas, tiempo en el cual, se descontinuó y la administración de los anticuerpos continuó. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como se muestra en la Figura 9, el anticuerpo anti-hDLL4 21M18 continuó mostrando crecimiento tumoral después de que se detuvo el tratamiento con irinotecano. En contraste, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab no fue capaz de inhibir el

crecimiento de nuevo del tumor después de que se había detenido la administración de irinotecano. La combinación del anticuerpo anti-DLL4 21M18 y el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab dio por resultado mayor inhibición del crecimiento de nuevo del tumor que cualquier agente solo. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 fue más efectivo en inhibir el crecimiento de nuevo del tumor que la mezcla de los dos anticuerpos.

Ejemplo 10

Reducción en la tumorigenicidad de tumores de colon OMP-C8

Suspensiones de células individuales de xenoinjerto de tumor de colon OMP-C8 (20,000 células) se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 300mm^3. Los ratones se eligieron al azar (n = 5 por grupo) y se trataron con anticuerpo anti-DLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, una combinación de anticuerpos 21M18 y bevacizumab, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79, o el anticuerpo de control, ya sea en combinación con irinotecano o sin irinotecano. Los anticuerpos e irinotecanos se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se dosificaron a 7.5mg/kg, los

anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se dosificaron a 15mg/kg, e el irinotecano se dosificó a 45mg/kg. Los tumores se recolectaron después de 4 semanas, se procesaron en suspensiones de células individuales, y las células tumorales humanas se aislaron. 150 células tumorales de cada grupo experimental se inyectaron subcutáneamente en un nuevo cohorte de ratones (n = 10 por grupo) y los tumores se dejaron desarrollar sin tratamiento. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos.

Los volúmenes de tumor individuales en el día 68 se muestran en la Figura 10. El anticuerpo anti-DLL4 21M18, la combinación de 21M18 con el anticuerpo unanti-VEGF bevacizumab, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, y el irinotecano redujeron la frecuencia del crecimiento tumoral como agentes individuales. En contraste, el bevacizumab anti-VEGF como un solo agente no tuvo efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral como es comparado con el anticuerpo de control. En los grupos tratados con una combinación de irinotecano y anticuerpos, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tuvo el efecto más grande en la reducción de la frecuencia del crecimiento tumoral.

Ejemplo 11

Inhibición del crecimiento tumoral del colon OMP-C8 *in vivo*

Suspensiones de células individuales de xenoinjertos de

tumor de colon OMP-C8 (50,000 células) se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6.8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 21 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 80mm^3. Los ratones se eligieron al azar (n = 8 por grupo) y se trataron con el anticuerpo anti-DLL4 21M18, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R83, o el anticuerpo de control, ya sea solos o en combinación con irinotecano. Los anticuerpos y el irinotecano se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. El bevacizumab y los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, y 219R45-MB-21R83 se dosificaron en 15mg/kg, y el irinotecano se dosificó a 7.5mg/kg. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como agentes individuales, los cuatro anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 mostraron actividad anti-tumor mejorada relativa con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab. En combinación con el irinotecano, el tratamiento con los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R83 dio por resultado la inhibición más grande del crecimiento tumoral (Figura 11).

Después de la fase de tratamiento, las secciones de tumor se prepararon y se analizaron por tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Los tumores tratados con 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R83 en combinación con irinotecano mostraron regiones de tinción rosadas oscuras que proporcionan evidencia de calificación extensiva. Esto es característico del tejido tumoral sumamente necrótico.

Ejemplo 12

Estudio de toxicidad no de GLP de anticuerpos biespecíficos en monos cynomolgus

Un estudio de toxicidad no GLP en monos cynomolgus se inició para evaluar y comparar el perfil de toxicidad de algunos de los anticuerpos biespecíficos. Los animales se dosificaron con 0 mg/kg (control), 5 mg/kg (dosis baja), o 30 mg/kg (dosis alta) de anticuerpo biespecífico anti-DLL4/anti-VEGF (219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R83, o 219R45-MB-21R79) cada 2 semanas a través de infusión IV. 3 mujeres y 3 hombres se dosificaron en cada grupo. Después de 15 semanas, los pesos corporales medios fueron menores en los animales que recibieron la dosis alta de 219R45-MB-21R79 que en animales que recibieron la dosis alta de ya sea 219R45-MB-21R18 o 219R45-MB-21R83. Además, los niveles de albúmina de suero medios fueron menores en animales que recibieron 219R45-MB-21R79 que en aquellos que recibieron ya sea 219R45-MB-21R18 o 219R45-MB-21R83. Aunque preliminares en carácter, estos

resultados tempranos sugieren que 219R45-MB-21R18 y 219R45-MB-21R83 pueden tener un perfil de toxicidad superior comparados con 219R45-MB-21R79.

Se va a entender que los ejemplos y modalidades descritos en la presente son para propósitos ilustrativos solamente y que varias modificaciones o cambios en vista de los mismos serán sugeridos a personas expertas en el campo y se van a incluir dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud.

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente, sitios de internet, y números de acceso/secuencias de bases de datos incluyendo tanto secuencias de polinucleótidos y polipéptidos citadas en la presente se incorporan por este medio a manera de referencia en la presente en su totalidad para todos los propósitos al mismo grado como si cada publicación individual, patente, solicitud de patente, sito de internet, o número de acceso/secuencia de base de datos se indicó específica e individualmente para ser incorporada de esta manera a manera de referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 21M18 (SEQ ID NO:1)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 21R79 (SEQ ID NO:2)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 219R45 (SEQ ID NO:3)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:4)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWF
QQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPW
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21M18 (SEQ ID NO:5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R79 (SEQ ID NO:6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 219R45 (SEQ ID NO:7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:8)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

Región variable de cadena pesada 21R79 (SEQ ID NO:10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

Región variable de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVSS

Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:12)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS

GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

CDR1 de cadena pesada 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:13)

TAYYIH

CDR1 de cadena pesada alteARNtiva 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:79)

AYYIH

CDR2 de cadena pesada 21R79 (SEQ ID NO:14)

YIANYNRATNYNQKFKG

CDR2 de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:15)

YISSYNGATNYNQKFKG

CDR3 de cadena pesada 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:16)

RDYDYDVGMDY

CDR1 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:17)

NYWMH

CDR2 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:18)

DINPSNGRTSYKEKFKR

CDR3 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:19)

HYDDKYYPLMDY

CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:20)

RASESVDNYGISFMK

CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:21)

AASNQGS

CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:22)

QQSKEVPWTFGG

DLL4 humano con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:23)

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
GDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL
CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCE
HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR
GPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS
IDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVG

DLL4 humano sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:24)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL
SCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCST
PWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELS
ECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANY
ACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCAR
NPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVC
NCPYGFVGSRCEFPVG

Región N-Terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO:25)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT

NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ GSLAVGQN

Dominio DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO:26)

WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG EYC

VEGF humano-A con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:27)

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVD IFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPG PHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

VEGF humano-A sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:28)

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGC CNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG KGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSC KNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21M18 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:29)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT GGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTACAAC CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATG GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCCTCC ACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC

TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT

AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21R79 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:30)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC

TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCACCA

GGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTACAAC

CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTACATG

GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCCGCCTCC

ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC

TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT

AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21R79 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:31)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 219R45 (13A Versión 1) (SEQ ID NO:32)

ATGAAGCATCTGTGGTTTTTCCTGTTGCTCGTGGCGGCACCCAGATGGGTGTTGTCCCAA

GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTATCG

TGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCTCCG

GGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATATAAG

GAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTACATG

GAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTATGAT

GACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCCAGC

GCGTCGACGAAAGGTCCCTCGGTATTTCCCCTCGCCCCCTGCTCGAGGTCGACATCCGAA

TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCGGTAACGGTGTCG

TGGAACTCGGGAGCGCTTACGTCCGGAGTCCACACATTTCCGGCGGTACTGCAATCCTCG

GGACTGTATTCGTTGTCGTCAGTGGTGACTGTCCCGTCCTCCAATTTCGGGACTCAGACC

TATACGTGCAACGTCGACCACAAACCCTCAAACACCAAGGTGGATAAGACAGTGGAGCGC

AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCGTGTCCGGCACCCCCTGTCGCCGGACCCTCAGTCTTT

TTGTTTCCGCCGAAGCCCAAAGATACACTCATGATCTCAAGAACGCCCGAGGTAACATGC

GTGGTGGTCGATGTAAGCCACGAGGATCCAGAAGTACAATTCAATTGGTATGTAGACGGG

GTCGAGGTCCATAACGCAAAGACGAAACCGAGGGAAGAGCAGTTCAATTCGACTTTCCGG

GTGGTGTCGGTGCTTACAGTCGTACATCAGGACTGGTTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGT

AAAGTATCGAATAAGGGCCTTCCAGCGCCGATTGAAAAGACCATCTCCAAGACCAAAGGA

CAGCCACGAGAGCCGCAAGTCTATACGCTTCCTCCCAGCCGAGAAAAGATGACTAAAAAC

CAGGTATCGCTTACGTGTCTCGTCAAGGGTTTCTACCCTTCGGACATCGCGGTGGAATGG

GAGAGCAATGGACAACCGGAAAACAACTACAAGACGACACCGCCTATGTTGAAAAGCGAT

GGATCGTTTTTCCTCTATTCGAAACTCACGGTCGATAAGTCACGGTGGCAGCAGGGGAAT

GTGTTCTCCTGTTCAGTGATGCACGAGGCGCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG

TCACTTTCCCCGGGAAAATGA

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 219R45 (13A Versión 2) (SEQ ID NO:33)

ATGAAGCACCTCTGGTTCTTCCTGCTCCTCGTGGCTGCTCCTCGGTGGGTCCTCTCCCAA

GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTCTCC

TGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCT

GGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTACAAG

GAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTACATG

GAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTACGAC

GACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCCAGC

GCTTCCACAAAAGGACCCTCCGTCTTTCCCCTCGCCCCCTGCTCCCGGTCCACATCCGAA

TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCTGTCACAGTGTCC

TGGAACTCCGGAGCTCTCACATCCGGAGTCCACACATTTCCTGCTGTGCTCCAATCCTCC

GGACTGTATTCCCTCTCCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAATTTCGGGACACAGACC

TATACATGCAACGTGGACCACAAACCCTCCAACACCAAAGTCGATAAGACAGTGGAGCGC

AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCTTGTCCTGCTCCCCCTGTGGCTGGACCTTCCGTCTTT

CTGTTTCCTCCTAAACCTAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGC

GTGGTCGTCGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCCAATTTAATTGGTATGTGGACGGG

GTGGAGGTCCATAACGCTAAGACCAAACCTAGGGAAGAGCAGTTCAATTCCACTTTCCGG

GTGGTGTCCGTGCTGACCGTCGTTCATCAGGACTGGCTCAACGGGAAAGAATACAAATGC

AAAGTCTCTAATAAGGGCCTCCCTGCTCCTATTGAAAAAACAATTTCCAAAACAAAAGGA

CAACCTCGGGAGCCTCAAGTCTACACACTGCCACCTTCCCGGGAAAAAATGACAAAAAAT

CAAGTCTCCCTCACATGTCTCGTCAAGGGATTCTACCCTTCCGACATTGCTGTGGAATGG

GAATCCAATGGACAACCTGAAAACAACTACAAGACAACACCTCCTATGCTCAAAAGCGAT

GGGTCCTTTTTCCTCTATTCCAAACTCACAGTCGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGGAAT

GTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG

TCCCTCTCCCCTGGAAAATGA

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera (SEQ ID NO:34)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC

ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC

CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT

GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC

TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG

ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC

ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTCGTGTGCCTGCTG

AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC

GGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC

TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG

ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGTTAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:35)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC

CCTGGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 (13B) (SEQ ID NO:36)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCA

CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada

21R79 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:37)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 (13A versión 1) (SEQ ID NO:38)

CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTA
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCT
CCGGGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATAT
AAGGAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTAC
ATGGAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTAT
GATGACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCC
AGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 (13A Versión 2) (SEQ ID NO:39)

CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTC
TCCTGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCT
CCTGGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTAC
AAGGAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTAC
ATGGAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTAC
GACGACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCC
AGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:40)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

Región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:41)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG2 humana (SEQ ID NO:42)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG3 humana (SEQ ID

NO:43)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE
ALHNRFTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG4 humana (SEQ ID NO:44)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Péptido FLAG (SEQ ID NO:45)

DYKDDDDK

Cadena pesada 21R79 parenteral con cadena no modificada de secuencia señal subrayada (SEQ ID NO:46)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de 219R45 parenteral con secuencia señal subrayada (SEQ ID NO:47)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada 21R79 parenteral sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:48)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada 21R45 sin secuencia señal (SEQ ID NO:49)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY

KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS

SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF

RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 parenteral (SEQ ID NO:50)

CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATC

TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCG

CCAGGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTAT

AACCAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTAC

ATGGAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTAC

GACTATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 parenteral (SEQ ID NO:51)

CAGGTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTC

AGCTGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCC

CCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTAT

AAGGAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTAC

ATGGAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTAT

GACGATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGC

AGC

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R79 parenteral(SEQ ID NO:52)

ATGAAACACTTGTGGTTTTTCCTCTTGCTCGTGGCAGCTCCTCGGTGGGTACTTTCACAA
GTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATCTCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCGCCA
GGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTATAAC
CAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTACATG
GAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTACGAC
TATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCCGCCAGC
ACCAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGT
TGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG

TCTCCGGGTAAA

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 219R45 parenteral (SEQ ID NO:53)

ATGAAACACCTCTGGTTCTTTTTGCTCCTGGTGGCAGCTCCCCGATGGGTGCTTAGCCAG
GTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTCAGC
TGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCT
GGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTATAAG
GAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTACATG
GAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTATGAC
GATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGCAGC
GCGTCCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC

GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC

TCCCTGTCTCCGGGTAAA

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera 21R79 y 219R45 parenteral (SEQ ID NO:54)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC

ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC

CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC

GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC

AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG

ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera 21R79 y 219R45 parenteral (SEQ ID NO:55)

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGG

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC

ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC

CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC

GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC

AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG

ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCCCTCCGTCTTC

ATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAAAGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG

AATAACTTCTATCCCCGGGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAAGC

GGCAACTCCCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC

AGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC

ACCCATCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTTGA

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R75 (SEQ ID

NO:56)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal predicha 21R75 (subrayada) (SEQ ID NO:57)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIAGYKDATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región variable de cadena pesada 21R75 (SEQ ID NO:58)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

CDR2 de cadena pesada 21R75 (SEQ ID NO:59)

YIAGYKDATNYNQKFKG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:60)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión 1T) (SEQ ID NO:77)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión S1-2) (SEQ ID NO:61)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAG

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R83 (SEQ ID NO:62)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal predicha 21R83 (subrayada) (SEQ ID NO:63)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISNYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región variable de cadena pesada 21R83 (SEQ ID NO:64)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY

NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

CDR2 de cadena pesada 21R83 (SEQ ID NO:65)

YISNYNRATNYNQKFKG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 1) (SEQ ID NO:66)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC

TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT

GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC

CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG

GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC

ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC

TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC

CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC

CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC

AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA

TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 1T) (SEQ ID NO:78)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC

TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT

GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC

CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG

GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC

ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC

TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC

CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC

CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC

AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA

TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 subrayada (13B Versión S1-2) (SEQ ID NO:67)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:68)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC

CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:69)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA

AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA

CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT

AACCAAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC

ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R83 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:70)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC

CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:71)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA

AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA

CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT

AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC

ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 2) (SEQ ID NO:72)

<u>ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCG</u>CAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R83 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:73)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA

AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA

CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTAT

AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC

ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 subrayada (13B Versión 2) (SEQ ID NO:74)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21M18 (versión 2) (SEQ ID NO:75)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Región variable de cadena pesada 21M18 (versión 2) (SEQ ID NO:76)

CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGTTGC
AAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCAGGA
CAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAACCAA
AAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATGGAA
TTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGATTAT
GATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia consenso de cadena pesada CDR2 de cadena pesada Anti-DLL4 (SEQ ID NO:80):

$YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$, donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente a VEGF humano, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 12.

5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

6. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al VEGF humano, caracterizado porque comprende:

(a) una cadena pesada que consiste esencialmente de f SEQ ID NO:49 o SEQ ID NO:7; y

(b) una cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:8.

7. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF.

8. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el receptor VEGF es VEGFR-1 o VEGFR-2.

9. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque modula la

angiogénesis.

10. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al ligando 4 similar a delta humano (DLL4), caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14) y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

11. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al ligando 4 similar a delta humano (DLL4), caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59) y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al ligando 4 similar a delta humano (DLL4), caracterizado

porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65) y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO: 20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

13. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 12.

14. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(b) una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

15. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ

ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, o SEQ ID NO:62; y

(b) una cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:8.

16. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-15, caracterizado porque inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch.

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el receptor Notch se selecciona del grupo que consiste de Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4.

18. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-17, caracterizado porque inhibe la señalización Notch.

19. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-18, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal.

20. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-19, caracterizado porque es un anticuerpo recombinante.

21. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado porque es un anticuerpo quimérico.

22. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, caracterizado porque es un anticuerpo humanizado.

23. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, caracterizado porque es un anticuerpo humano.

24. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, caracterizado porque un anticuerpo biespecífico.

25. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque es un anticuerpo IgG1.

26. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque es un anticuerpo IgG2.

27. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de ligación a anfígeno.

28. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende:

a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y

b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano,

en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena

pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19);

en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

29. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14).

30. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 15).

31. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59).

32. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65).

33. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(c) una primera y segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

34. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

35. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 10; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

36. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

37. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena

ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

38. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO:9; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

39. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 10; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

40. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO:58; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena

ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

41. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO:64; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

42. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-41, caracterizado porque comprende un primer dominio CH3 y un segundo dominio CH3, cada uno de los cuales se modifica para promover la formación de heteromultímeros.

43. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el primero y segundo dominios CH3 se modifica basado en los efectos electrostáticos.

44. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-43, caracterizado porque comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los

aminoácidos son lisina.

45. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-43, caracterizado porque comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato.

46. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el primero y segundo dominio CH3 se modifican usando una técnica de perillas en los agujeros.

47. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:5, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

48. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:6, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

49. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:56, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

50. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:62, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

51. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un fragmento N-terminal de DLL4 humano (aminoácidos 1-191 de SEQ ID NO:24).

52. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un epítopo que comprende aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25.

53. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un epítopo que comprende aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25.

54. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un epítopo que comprende aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25 y aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25.

55. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-46, caracterizado porque el primer sitio de ligación a antígeno se liga a VEGF

humano con una K_D de aproximadamente 100nM o menor y el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente l00nM o menor.

56. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste de 219R45-MB-21M18, 219R45-MB- 21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83.

57. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-56, caracterizado porque inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF.

58. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el receptor VEGF es VEGFR-1 o VEGFR-2.

59. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-58, caracterizado porque inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch.

60. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque el receptor Notch se selecciona del grupo que consiste de Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4.

61. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-60, caracterizado porque inhibe la señalización Notch.

62. El anticuerpo biespecífico de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 28-61, caracterizado porque modula la angiogénesis.

63. Un polipéptido, caracterizado porque comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

64. Una célula, caracterizada porque comprende el anticuerpo o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-63.

65. Una célula, caracterizada porque produce el anticuerpo o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-63.

66. La molécula de polinucleótido aislada, caracterizada porque comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-63.

67. Una molécula de polinucleótido aislada, caracterizada porque comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID

NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78.

68. Un vector, caracterizado porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 66 o la reivindicación 67.

69. Una célula, caracterizada porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 66 o la reivindicación 67 o el vector de conformidad con la reivindicación 68.

70. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-62, y un portador farmacéuticamente aceptable.

71. Un método para modular la angiogénesis en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

72. Un método para inhibir el crecimiento de un tumor, caracterizado porque comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

73. Un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

74. Un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

75. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 72-74, caracterizado porque el tumor se selecciona del grupo que consiste de tumor colorectal, tumor de colon, tumor de ovario, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de la vejiga, glioblastoma, y tumor de cabeza y cuello.

76. Un método para tratar cáncer en un sujeto,

caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

77. El método de conformidad con la reivindicación 76, caracterizado porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, el linfoma y leucemia.

78. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 71-77, caracterizado porque además comprende administrar un segundo agente terapéutico.

79. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

80. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque el segundo agente terapéutico es un segundo anticuerpo.

81. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 71 o 73-80, caracterizado porque el sujeto es humano.

82. Un método para la producción de un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende expresar por lo menos un polinucleótido de conformidad con la reivindicación 66 o reivindicación 67, en una célula.

83. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque la célula es una célula procariótica o una célula eucariótica.

84. El método de conformidad con la reivindicación 82 o la reivindicación 83, caracterizado porque además comprende aislar el anticuerpo biespecífico de la célula o el sobrenadante del cultivo celular.

85. Un anticuerpo que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, caracterizado porque el primer sitio de ligación a antígeno comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX1X2YX3X4ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

86. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación

85, caracterizado porque es un anticuerpo biespecífico y comprende además un segundo sitio de ligación a antígeno, en donde el segundo sitio de ligación a antígeno se liga específicamente al VEGF humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

87. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende (a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga a VEGF humano con una K_d entre aproximadamente 0.1nM y aproximadamente 1.0 nM y (b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 20 nM.

88. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85-87, y un portador farmacéuticamente aceptable.

89. Un método para tratar cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85-87.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a agentes de ligación a VEGF, agentes de ligación a DLL4, agentes de ligación biespecíficos a VEGF/DLL4, y métodos para usar los agentes para tratar enfermedades tales como cáncer. La presente invención proporciona anticuerpos que se ligan específicamente a VEGF humano, anticuerpos que se ligan específicamente a DLL4 humano, y anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente a VEGF humano y/o DLL4 humano. La presente invención proporciona además métodos para usar los agentes para inhibir el crecimiento tumoral. También se describen métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o anticuerpo de la presente invención a un paciente que tiene un tumor o cáncer.

AGENTES DE LIGACION AL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR/LIGANDO 4 SIMILAR A DELTA (VEGF/DLL4) Y USOS DE LOS MISMOS

Campo de la Invención

La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos y otros agentes que se ligan a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como DLL4, particularmente anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4, así como a métodos para usar los anticuerpos u otros agentes para el tratamiento de enfermedades tal como cáncer.

Antecedentes de la Invención

La angiogénesis desempeña una función importante en la patogénesis de una variedad de trastornos, incluyendo tumores sólidos y metástasis. La producción de nuevos vasos sanguíneos es esencial para proporcionar oxígeno y nutrientes para el crecimiento y propagación de un tumor, y por lo tanto la angiogénesis es un buen objetivo para los productos terapéuticos para el cáncer.

La angiogénesis incluye una familia de proteínas que actúan como activadores angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, por sus siglas en inglés), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, y sus receptores respectivos (VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3). El VEGF-A, también referido como VEGF o factor de permeabilidad vascular (VPF, por sus

siglas en inglés), existe en varias isoformas que surgen del empalme alteARNtivo de mARN de un gen VEGF individual, con el $VEGF_{165}$ que es la isoforma más biológicamente relevante.

Los anticuerpos anti-VEGF han mostrado que suprimen el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado, bevacizumab (AVASTIN) se ha desarrollado y aprobado en los Estados Unidos como un producto terapéutico para el cáncer.

La trayectoria de señalización Notch es un sistema de transducción de señal universalmente conservado. Se implica en la determinación del destino celular durante el desarrollo incluyendo la formación del patrón embriónico y el mantenimiento de tejido pos-embriónico. Además, la señalización Notch se ha identificado como un factor crítico en el mantenimiento de células madre hematopoyéticas.

La trayectoria Notch se ha relacionado con la patogénesis de tumores y cánceres tanto hematológicos como sólidos. Las numerosas funciones celulares y señales microambientales asociadas con la tumorigénesis han mostrado que se modulan por la señalización de la trayectoria Notch, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, adhesión, y angiogénesis (Leong y colaboradores, 2006, *Blood*, 107:2223-2233). Además, los receptores Notch y/o ligandos Notch han mostrado que desempeñan funciones oncogénicas potenciales en una variedad de cánceres humanos, incluyendo leucemia

mielogenosa aguda, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda de células T, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de la piel. (Leong y colaboradores, 2006, *Blood*, 107:2223-2233).

El ligando 4 similar a delta (DLL4, por sus siglas en inglés) es un componente importante de la trayectoria Notch y se ha identificado como un objetivo para la terapia para el cáncer. El DLL4 es un ligando Notch, caracterizado por un dominio N-terminal, un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) y repeticiones similares a EGF en tándem dentro del dominio extracelular. Se ha reportado que el DLL4 se induce por VEGF y que el DLL4 puede actuar como un regulador de retroalimentación negativo para la proliferación vascular.

Los anticuerpos anti-DLL4 han mostrado que mejoran la proliferación y ramificación angiogénica que conduce a la angiogénesis no productiva y crecimiento tumoral disminuido (Noguera-Troise y colaboradores, 2006, *Nature*, 444:1032-1037). Además, un anticuerpo anti-DLL4, 21M18, ha mostrado que inhibe el crecimiento tumoral y reduce la frecuencia de célula madre cancerosas en modelos de tumor de xenoinjerto (Hoey y colaboradores, 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-177; Patente de E. U. A. No. 7,750,124).

Aunque ha habido avances significativos en el desarrollo

de anticuerpos monoclonales para el uso en tratamientos del cáncer, existe a un gran potencial para mejoras adicionales. Una clase de moléculas de anticuerpo con la promesa de potencia aumentada y/o efectos secundarios reducidos (por ejemplo, toxicidad) son los anticuerpos biespecíficos.

Las moléculas biespecíficas tempranas se generaron principalmente usando reticulación química de dos anticuerpos, o fueron hibridomas o “cuadromas” híbridos. Un éxito del formato cuadroma es triomabs, que son combinaciones de ratón/rata que muestran un emparejado de cadena pesada/ligera específico d especies preferencial. Más recientemente, los avances en la ingeniería de anticuerpos han proporcionado una amplia variedad de nuevos formatos de anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, scFv en tándem (bi-scFv), diacuerpos, diacuerpos en tándem (tetra-cuerpos), diacuerpos de cadena individual, y anticuerpos de dominio variable dobles.

Es uno de los objetivos de la presente invención proporcionar moléculas mejoradas para el tratamiento del cáncer, particularmente anticuerpos biespecíficos que se liguen específicamente al VEGF humano y DLL4 humano.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona agentes de ligación, tales como anticuerpos, que se ligan a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como DLL4 (agentes de ligación a VEGF/DLL4), así como

composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden los agentes de ligación. Los agentes de ligación que se ligan a VEGF o DLL4, así como por lo menos un antígeno adicional u objetivo, y composiciones farmacéuticas de tales agentes de ligación, también se proporcionan. En ciertas modalidades, los agentes de ligación son polipéptidos novedosos, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y otros polipéptidos relacionados con tales anticuerpos. En ciertas modalidades, los agentes de ligación son anticuerpos que se ligan específicamente al VEGF humano. En algunas modalidades, los agentes de ligación son anticuerpos que se ligan específicamente al DLL4 humano. En algunas modalidades, los agentes de ligación son anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. La invención proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de un tumor al administrar los agentes de ligación a un sujeto con un tumor. La invención proporciona además métodos para tratar cáncer al administrar los agentes de ligación a un sujeto en necesidad de los mismos. En algunas modalidades, los métodos para tratar cáncer o inhibir el crecimiento tumoral comprenden células madre cancerosas objetivo con los agentes de ligación. En ciertas modalidades, los métodos comprenden reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, reducir el número de células madre cancerosas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un

tumor y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor al reducir el número o frecuencia de células madre cancerosas en el tumor.

En un aspecto, la invención proporciona un agente de ligación, tal como un anticuerpo, que se liga específicamente al VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de VEGF a VEGFR-1 y/o VEGFR-2. En algunas modalidades, el agente de ligación modula la angiogénesis. En ciertas modalidades, el anticuerpo u otro agente de ligación se ligan específicamente además a y/o inhibe el DLL4 humano además del VEGF.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesadas que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia

a SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es el anticuerpo 219R45, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, o 219R45-MB-21R83.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de ligación, tal como un anticuerpo, que se liga específicamente a DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la ligación de DLL4 a Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4. En

algunas modalidades, el agente de ligación inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación promueve la angiogénesis no productiva. En ciertas modalidades, el anticuerpo u otro agente de ligación se ligan específicamente además a y/o inhibe el VEGF humano además del DLL4 humano.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que se liga al DLL4 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID

NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10; y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo 21R79 o anticuerpo 219R45-MB-21R79.

En algunas modalidades, el agente de ligación en un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada

que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:58; y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo 21R75 o anticuerpo 219R45-MB-21R75.

En algunas modalidades, el agente de ligación en un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas

modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:64; y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo 21R83 o anticuerpo 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos o modalidades ya mencionadas, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en cualquier lugar en la presente, el agente de ligación es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente al VEGF humano y a un segundo objetivo. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente al DLL4 humano y a un segundo objetivo. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a tanto VEGF humano como DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico modula la angiogénesis. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico modula la angiogénesis e inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico reduce el número de frecuencia de células madre cancerosas. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas. En ciertas modalidades el anticuerpo

biespecífico es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG2).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sito deligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico

comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de

cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH

(SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que

comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una

CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de

cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente DLL4 humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo

biespecífico se liga específicamente DLL4 humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, y comprende: (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95%

de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64; y (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende (a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga a VEGF humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 1.0 nM y (b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga

específicamente DLL4 humano con un a K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 20 nM. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico seleccionado del grupo que consiste de 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos ya mencionados, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en cualquier lugar en la presente, el agente de ligación o anticuerpo se aísla.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En algunas modalidades, el polipéptido se aísla. En ciertas modalidades, el polipéptido es sustancialmente puro. En ciertas modalidades, el polipéptido es un anticuerpo o parte de un anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de polinucleótido aisladas que comprenden un polinucleótido que

codifica los agentes de ligación y/o polipéptidos de cada uno de los aspectos ya mencionados, así como otros aspectos y/o modalidades descritos en la presente. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, y SEQ ID NO:74. La invención proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos, así como células que comprenden los vectores de expresión y/o los polinucleótidos. En algunas modalidades, la célula es una célula procariótica o una célula eucariótica.

En otros aspectos, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de esos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que

comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para modular la angiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como DLL4, incluyendo a cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto al reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4, o a tanto VEGF como DLL4,

incluyendo a cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de ligación) que se liga a VEGF, DLL4, o a tanto VEGF como DLL4, incluyendo a cada uno de esos anticuerpos (u otros agentes de ligación) descritos en la presente.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una gente de ligación (por ejemplo, anticuerpos) descritas en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable se proporcionan adicionalmente, como son líneas de células que expresan y/o producen los agentes de ligación. Los métodos para tratar cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto (por ejemplo, un humano) que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende los agentes de ligación también se proporcionan.

Donde los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención abarca no solamente la totalidad de la lista en su conjunto, sino también cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal, y también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente

invención también prevé la exclusión explicita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reclamada.

Breve Descripción De Las Figuras

Figuras 1A-1C. Fig. 1A, CDRs de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21M79, 219R45-MB-21M75, y 219R45-MB-21M83; Fig. 1B) Región variable de cadena pesada y cadena ligera SEQ ID NOs; Fig. 1C) SEQ ID Nos dé cadena pesada y cadena ligera.

Figura 2. Ensayo HTRF para ligación simultánea de anticuerpos biespecíficos al VEGF humano y DLL4 humano. Los resultados se reportan en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU, por sus siglas en inglés), que representa la relación de la intensidad de fluorescencia relativa a 665nm a la intensidad de fluorescencia relativa a 620nm. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 219R45 más 21M18 (-▲-); 219R45 más 21R79 (-□-); 219R45 (-▼-); 21M18 (-◊-); 21R79 (-○-); anticuerpo de control LZ-1 (-Δ-).

Figura 3. Inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF por los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. La intensidad de fluorescencia se lee usando una longitud de onda de excitación de 530nm y una longitud de emisión de 590. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-▲-); 219R45 (-■-); Medio sin VEGF (-◊-).

Figura 4. Inhibición de la señalización Notch inducida por DLL4 por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. La actividad de luciferasa se midió usando un kit de ensayo de luciferasa doble con actividad de luciferasa de Luciérnaga normalizada con la actividad de luciferasa de Renilla. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 21M18 (-o-); 21R79 (-□-).

Figura 5. Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* por un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en un injerto de piel humana en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (-▲-), anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (-o-), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-▼-). Los datos se muestran como volumen de tumor (fotones/sec) durante los días pos-tratamiento. Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 25mg/kg una vez a la semana.

Figura 6. Tumorigenicidad de células tumorales pancreáticas después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales OMP-PN8 de ratones tratados con anticuerpo de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18

o 219R45-MB-21R79 con o sin gemcitabina se procesaron a suspensiones de células individuales, y se trasplantaron en serie en ratones. 90 células de cada grupo de tratamiento se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los tumores se dejaron desarrollar sin ningún tratamiento. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) en el día 55. La frecuencia del tumor se muestra como un número de tumores sobre el número total de ratones inyectados en cada grupo.

Figura 7. ELISA de anticuerpo biespecífico. Anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo (1x de PBS, 0.1% de gelatina, 0.1% de Polisorbato-20, pH 7.4) que contiene 2µg/ml de biotina-DLL4-hFc. Los anticuerpos se diluyeron en serie 3 veces de 500ng/ml a 0.008ng/ml. Las muestras de anticuerpos se incubaron durante 2 horas en solución amortiguadora de bloqueo que contiene la biotina-DLL4-hFc. Después de la incubación, las muestras de anticuerpos se transfirieron a una placa de ensayo recubierta con VEGF (100 ul/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Se agregó Estreptavidina-HRP a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. El sustrato TMB se agregó a los pocillos con un desarrollo de color de 10 minutos y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se leyó a 450-650nm y los datos se analizaron usando el ajuste de 4 parámetros dentro del programa de

análisis Softmax Pro.

Figura 8. Enfoque isoeléctrico capilar formado en imagen de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4.

Figura 9. Inhibición del crecimiento del tumor del colon por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 en un modelo de recurrencia de tumor. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (-●-), anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (-▲-), una combinación de 21M18 y bevacizumab (-▼-), anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-◊-), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 (-o-), todos en combinación con irinotecano. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se administraron intraperitonealmente en una dosis de 7.5mg/kg una vez a la semana, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se administraron intraperitonealmente en una dosis de 15mg/kg una vez a la semana, y el irinotecano se administró para las primeras 4 semanas en una dosis de 45mg/kg. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) durante los días pos-tratamiento.

Figura 10. La tumorigenicidad de células tumorales de colon OMP-C3 después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Los tumores de ratones tratados con anticuerpo de control, anticuerpo anti-hDLL4

21M18, anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab, una combinación de 21M18 y de bevacizumab, o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 con o sin irinotecano se procesaron a suspensiones de células individuales, y se trasplantaron en serie en ratones. 150 células de cada grupo de tratamientos se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los tumores se dejaron desarrollar sin ningún tratamiento. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) en el día 68.

Figuras 11A-11B. Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab (-▲-), o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-◊-), 219R45-MB-21R75 (-●-), 219R45-MB-21R79 (-o-), o 219R45-MB-21R83 (-▼-). Los ratones se trataron con anticuerpos como agentes individuales (Fig. 11A) o en combinación con irinotecano (Fig. 11B). Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 15mg/kg una vez a la semana e irinotecano en una dosis de 7.5mg/kg una a la semana. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm^3) durante los días pos-tratamiento.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona agentes de ligación

novedosos, que incluyen pero no se limitan a polipéptidos tales como anticuerpos, que se ligan a VEGF y/o DLL4 (por ejemplo, un agente de ligación VEGF/DLL4). Los polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4, y métodos para elaborar los agentes de ligación VEGF/DLL4 también se proporcionan. Métodos para usar los agentes de ligación VEGF/DLL4 novedosos, tales como métodos para inhibir el crecimiento tumoral, métodos para tratar el cáncer, métodos para reducir la tumorigenicidad de un tumor, métodos para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor y/o métodos para modular la angiogénesis, se proporcionan adicionalmente.

Un anticuerpo monoclonal que se liga específicamente al VEGF humanos se ha identificado, 219R45. Ese anticuerpo tiene una afinidad de ligación para el VEGF humano de aproximadamente 0.67nM, y una afinidad de ligación para VEGF de ratón de aproximadamente 23nM. Varios anticuerpos monoclonales que se ligan específicamente al DLL4 humano se han identificado, 21R79, 21R75 y 21R83. El anticuerpo 21R79 tiene una afinidad de ligación para el DLL4 humano de menor que 0.1nM. Los anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente al VEGF humano y al DLL4 humano se han producido, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 (secuencias CDR en las Figuras 1A-1C). Como

se usa en la presente, el “MB” dentro de un nombre de anticuerpo se refiere a “monovalente/biespecífico”. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tiene una afinidad de ligación para el VEGF humano de menor que 1.0nM y una afinidad de ligación para el DLL4 de aproximadamente 16nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tiene una afinidad de ligación al VEGF de menor que 1.0nM y una afinidad de ligación para el DLL4 humano de menor que 1.0nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75 tiene una afinidad de ligación para el DLL4 humano de aproximadamente 5nM, mientras que el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83 tiene una afinidad de ligación para el DLL4 humano de aproximadamente 1nM. Los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se ligan al VEGF de ratón (Ejemplo 1, Tabla 3). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se ligan al VEGF humano y DLL4 simultáneamente (Ejemplo 2, Figura 2). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC (Ejemplo 3, Figura 3). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la señalización Notch inducida por DLL4 (Ejemplo 4, Figura 4). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben el crecimiento tumoral (Ejemplos 5, 9, 11 y Figuras 5, 9, 11A-11B). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la tumorigenicidad (Ejemplos 6 y 10 y Figuras 6, 10). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se

ligan tanto a VEGF como DLL4 en un ELISA biespecífico (Ejemplo 7, Figura 7). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se aíslan y purifican a un producto que comprende por lo menos 90% de anticuerpo heterodimérico (Ejemplo 8, Tabla 7).

I. Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la presente invención, una variedad de términos y frases se definen a continuación.

El término “anticuerpo” como se usa en la presente se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se liga específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores, a través de por lo menos un sitio de reconocimiento a antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos de cadena individual, fragmento de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')2, y fragmentos Fv), anticuerpos Fv de cadena individual (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un sitio de ligación a antígeno de un anticuerpo,

y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno (es decir, sitio de ligación a antígeno) siempre y cuando los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2), basado en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidad diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser desnudos o conjugados a otras moléculas, incluyendo pero no limitado a, toxinas y radioisótopos.

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables de determinación antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')2, y fragmentos de Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena individual, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. “Fragmento de anticuerpo” como se usa en la presente comprende un sitio de ligación a antígeno o sitio de ligación a epítopo.

El término “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de una cadena ligera de anticuerpo o la región variable de una cadena pesada de anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras consisten cada una de cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) conectadas por tres regiones de determinación de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés), también conocidas como “regiones hipervariables”. Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por regiones de estructura y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de ligación a antígeno del anticuerpo. Existen por lo menos dos técnicas para determinar las CDRs: (1) un procedimiento basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y colaboradores, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición*, National Institutes of Health, Bethesda, MD), y (2) un procedimiento basado en estudios cristalográficos de complejos de antígenos-anticuerpo (Al-Lazikani y colaboradores, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). Además, las combinaciones de estos dos procedimientos se usan algunas veces en la técnica para determinar la CDRs.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente se refiere a una población de anticuerpos homogéneos implicados en el reconocimiento y ligación sumamente

específica de un determinante o epítopo antigénico individual. Esto es en contraste con los anticuerpos monoclonales que incluyen típicamente una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos contra una variedad de determinantes antigénicos diferentes. El término “anticuerpo monoclonal” abarca tanto anticuerpos monoclonales intactos como de longitud completa así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos de cadena individual (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno (sitio de ligación a antígeno). Adicionalmente, el “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos fabricados por cualquier número de técnicas incluyendo pero no limitado a, producción de hibridoma, selección en fago, expresión recombinante, y animales transgénicos.

El término “anticuerpo humanizado” como se usa en la presente se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las CDRs se reemplazan por residuos de la CDRs de una especie no humana (por

ejemplo, ratón, rata, conejo, o hámster) que tienen la especificidad deseada, afinidad y/o capacidad de ligación (Jones y colaboradores, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann y colaboradores, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen y colaboradores, 1988, *Science*, 239:1534-1536). En algunos casos, los residuos de región de estructura Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tienen la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación. El anticuerpo humanizado se puede modificar además por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar u optimizar la especificidad de anticuerpos, afinidad, y/o capacidad de ligación. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen, todo o sustancialmente todo de la CDRs que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas de las regiones de estructura son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos usados para

generar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, Patente de E.U.A. 5,225,539.

El término “anticuerpo humano” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano. Un anticuerpo humano se puede fabricar usando cualquiera de las técnicas conocidas en el campo. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende CDRs no humanas.

El término “anticuerpo quimérico” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación, mientras que las regiones constantes corresponden a las secuencias en los anticuerpos derivados de otras especies (usualmente humano).

La frase “anticuerpo madurado por afinidad” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo que da por resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, comparado con un anticuerpo precursor que no posee esas

alteraciones. La definición también incluye alteraciones en los residuos no de CDR hechos en conjunción con las alteraciones a los residuos CDR. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares a un picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por los procedimientos conocidos en el campo. Por ejemplo, Marks y colaboradores, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, describe maduración por afinidad mediante transposición de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o los residuos de estructura se describe por Barbas y colaboradores, 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier y colaboradores, 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton y colaboradores, 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson y colaboradores, 1995, *J. Immunol.*, 154:3310-9; y Hawkins y colaboradores, 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede usar para obtener anticuerpos madurados por afinidad.

Los términos “epítopo” y “determinante antigénico” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocida y liga específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos se pueden formar tanto de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados de aminoácidos contiguos (también referidos

como epítopos lineales) se retienen típicamente en la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario (también referidos como epítopos conformacionales) se pierden típicamente en la desnaturalización de la proteína. Un epítopo incluye típicamente por lo menos 3, y más usualmente, por lo menos 5 o 8–10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los términos “molécula heteromultimérica” o “heteromultímero” o “complejo heteromultimérico” o “polipéptido heteromultimérico” se usan intercambiablemente en la presente para referirse a una molécula que comprende por lo menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido por al menos un residuo de aminoácido. La molécula heteromultimérica puede comprender un “heterodímero” formado por el primero y segundo polipéptido o puede formar estructuras terciarias de orden superior donde están presentes los polipéptidos adicionales.

Los términos “antagonista” y “antagonístico” como se usa en la presente se refieren a cualquier molécula que bloquea parcial o completamente, inhibe, reduce, neutraliza una actividad biológica de un objetivo y/o rutas de señalización (por ejemplo, la trayectoria Notch). El término “antagonista” se usa en la presente para incluir cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba, reduzca o neutralice

la actividad de una proteína. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente, pero no se limitan a, anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpo.

Los términos “modulación” y “modulan” como se usa en la presente se refiere a un cambio o una alteración en una actividad biológica. La modulación incluye, pero no se limita a, estimular o inhibir una actividad. La modulación puede ser un incremento o una disminución en la actividad (por ejemplo, una disminución en la angiogénesis o un incremento en la angiogénesis), un cambio en las características de ligación, o cualquier otro cambio en las propiedades biológicas, funcionales inmunológicas asociadas con la actividad de una proteína, ruta, u otro punto biológico de interés.

Los términos “se liga selectivamente” o “se liga específicamente” significa que un agente de ligación o un anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de lo anterior al epítopo, proteína, o molécula objetivo que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. En ciertas modalidades, “se liga específicamente” significa, por ejemplo, que un anticuerpo se liga a una proteína con una K_D por lo menos aproximadamente de 0.1mM o menos, pero más usualmente menor que aproximadamente 1μM. En ciertas modalidades, “se liga específicamente” significa que un anticuerpo se liga a un objetivo a veces con

una K_D de por lo menos aproximadamente de 0.1µM o menos, en otras veces por lo menos aproximadamente 0.01µM o menos, y en otras veces por lo menos aproximadamente 1nM o menos. Debido a que la identidad de secuencia entre las proteínas homologas en diferentes especies, la ligación específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína en más de una especie (por ejemplo, VEGF humano y VEGF de ratón). Del mismo modo, debido a la homología dentro de ciertas regiones de las secuencias de polipéptidos de diferentes proteínas, la ligación específica puede incluir un anticuerpo (u otro polipéptido o agente de ligación) que reconoce más de una proteína (por ejemplo, VEGF-A humana y VEGF-B humana). Se entiende que, en ciertas modalidades, un anticuerpo o porción de ligación que liga específicamente un primer objetivo puede o no ligarse específicamente a un segundo objetivo. Como tal "ligación específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) ligación exclusiva, ligación a un objetivo individual. De esta manera, un anticuerpo puede, en ciertas modalidades, ligarse específicamente a más de un objetivo. En ciertas modalidades, múltiples objetivos se pueden ligar por el mismo sitio de ligación a antígeno en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede, en ciertos casos, comprender dos sitios de ligación a antígenos idénticos, cada uno de los cuales se liga específicamente al mismo epítopo en dos o más proteínas. En ciertas modalidades alternativas, un anticuerpo

puede ser multiespecífico y comprende por lo menos dos sitios de ligación a antígeno con especificidades diferentes. A manera de ejemplo no limitante, un anticuerpo biespecífico puede comprender un sitio de ligación a antígeno que reconoce un epítopo en una proteína (por ejemplo, VEGF humanos) y comprende además un segundo sitio de ligación a antígeno diferente que reconoce un epítopo diferente en una segunda proteína (por ejemplo, DLL4 humano). Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la ligación significa ligación específica.

Los términos “polipéptido” y “péptido” y “proteínas” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y se puede interrumpir por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de ligación a disulfuro, glicosilación, lapidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende, que debido a que los polipéptidos de

esta invención se pueden basar en anticuerpos, en ciertas modalidades, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas individuales o cadenas asociadas.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa.

“Condiciones de alta severidad” se pueden identificar por aquellos que: (1) emplean resistencia iónica baja y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 15mM/citrato de sodio 1.5mM/0.1% de dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplear durante la hibridación en un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0.1% de albumina de suero bovino/ 0.1% de Ficol/0.1% de polivinilpirrolidona/solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM pH 6.5 en 5x SSC (NaCl 0.75M, citrato de sodio 75mM) a 42°C; o (3) emplear durante la hibridación 50% de formamida en 5x SSC, fosfato de sodio 50mM (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, 5x de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón pasado por ondas sonoras (50µg/ml), 0.1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C a 0.2x de SSC y 50% formamida, seguido por un lavado de

alta severidad que consiste de 0.1x de SSC que contiene EDTA a 55°C.

Los términos “idéntico” o porcentaje “de identidad” en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácido que son los mismos, cuando se comparan y se alinean (espacios de introducción, si es necesario) para correspondencia máxima, no considerando ninguna sustitución de aminoácido conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir usando software o algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual. Varios algoritmos y software que se pueden usar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácido o nucleótidos son bien conocidos en el campo. Estos incluyen, pero no se limitan a, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, y variaciones de los mismos. En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención son sustancialmente idénticos, significan que tienen por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, y en algunas modalidades por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de residuos de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, como es debido usando un algoritmo de comparación de secuencia o por inspección

visual. En algunas modalidades, la identidad existe sobre una región de las secuencias que es por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40-60 residuos, por lo menos aproximadamente 60-80 residuos en longitud o cualquier valor integral entre los mismos. En algunas modalidades, la identidad existe sobre una región más larga que 60-80 residuos, tal como por lo menos aproximadamente 80-100 residuos, en algunas modalidades las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, tal como la región de codificación de una secuencia de nucleótidos.

Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en la cual un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuo de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en el campo, incluyendo cadenas laterales básicas, (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo,

tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. De manea preferible, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la invención no anulan la ligación del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno al cual el polipéptido o anticuerpos se liga. Los métodos para identificar las sustituciones conservadoras de nucleótidos o aminoácidos que no eliminan la ligación al antígeno son bien conocidos en el campo.

El término “vector” como se usa en la presente significa un constructo, que es capaz de suministrar, y usualmente expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula hospedera. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmido, cósmido, o vectores fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que se “aísla” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Polipéptidos aislados, polipéptidos, polinucleótidos,

vectores, células, o composiciones incluyen aquellas que se han purificado a un grado que ya no están en una forma en la cual se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que se aísla es sustancialmente pura.

El término “sustancialmente puro” como se usa en la presente se refiere a un material que es por lo menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), por lo menos 90% puro, por lo menos 95% puro, por lo menos 98% puro, o por lo menos 99% puro.

Los términos “cáncer” y “canceroso” como se usa en la presente se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos en los cuales una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma, sarcoma, y canceres hematológicos tales como linfoma y leucemia.

Los términos “tumor” y “neoplasma” como se usa en la presente se refiere a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento celular excesivo o proliferación, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones pre-cancerosas.

Los términos “metástasis” como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual un cáncer se propaga o transfiere desde el sitio de origen hasta otras regiones del

cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en una nueva ubicación. Una célula “metastásica” o “metastasizante” es una que pierde los contactos adhesivos con células vecina y migra a través del torrente sanguíneo por nudos linfáticos desde el sitio primario de la enfermedad para invadir las estructuras corporales vecinas.

Los términos “célula madre cancerosa” y “CSC” y “célula madre tumoral” y “célula iniciadora de tumor” se usan intercambiablemente en la presente y se refieren a células de un cáncer o tumor que: (1) tienen capacidad proliferativa extensiva; (2) son capaces de división células asimétrica para generar uno o más tipos de progenie de células diferenciadas en donde las células diferenciadas tienen potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones de células simétricas para auto renovación o auto mantenimiento. Estas propiedades confieren para las células madre cancerosas la capacidad de formar o establecer un tumor o cáncer en trasplante en serie en un hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, un ratón) comparada con la mayoría de células tumorales que no logran formar tumores. Las células madre cancerosas se someten al auto renovación versus diferenciación en una manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar a través del tiempo conforme se presentan las mutaciones.

Los términos “célula cancerosa” y “célula tumoral” se refiere a la población total de células derivadas de un cáncer o tumor o lesión pre-cancerosa, incluyendo ambas células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células cancerosas, y células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Como se usa en la presente, los términos “célula cancerosa” o “célula tumoral” se modificarán por el término “no tumorigénicos” cuando se refiere solamente a esas células que carecen de la capacidad de renovación y diferenciarse para distinguir esas células tumorales de las células madre cancerosas.

El término “tumorigénico” como se usa en la presente se refiere a las características funcionales de una célula madre cancerosa incluyendo las propiedades de auto renovación (que da origen a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar otras células tumorales (que da origen a células tumorales diferenciadas y de esta manera no tumorigénicas).

El término “tumorigenicidad” como se usa en la presente se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células del tumor para formar tumores palpables en el trasplante en serie en los hospederos inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones). Esta definición también incluye poblaciones enriquecidas y/o aisladas de células madre cancerosas que forman tumores palpables en el trasplante en serie en

hospederos inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones).

El término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores, y similares, que van a ser el recipiente de un tratamiento particular. Típicamente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan intercambiablemente en la presente en referencia a un sujeto humano.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un producto o compuesto aprobado (o aprobable) por una agencia reguladora del gobierno Federal o gobierno estatal o listado en la Farmacopea de E.U.A u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, incluyendo humanos.

Los términos “excipiente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable” o “portador farmacéutico aceptable” se refiere a un excipiente, portador o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con por lo menos un agente de ligación (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente descripción, y que no destruye la actividad del agente de ligación. El excipiente, portador o adyuvante no deben ser tóxicos cuando se administran con un agente de ligación en dosis suficientes para administrar un efecto terapéutico.

Los términos “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” o “efecto terapéutico” se refieren

a una cantidad de un agente de ligación, un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco efectivo para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) tiene un efecto terapéutico y como tal puede reducir el número de células cancerosas; disminuir la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica; reduce el número de frecuencia de células madre cancerosas; reduce el tamaño del tumor; reduce la población de células cancerosas; inhibe y/o detiene la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación de cáncer en el tejido blando y huesos; inhibe y/o detiene la metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibe y/o detiene el crecimiento de células tumorales o cancerosas; alivia a un grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reduce la morbidez y mortalidad; mejora la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. En la medida en que el agente, por ejemplo un anticuerpo, prevenga el crecimiento y/o extermine células cancerosas existentes, se puede referir como citostático y/o citotóxico.

Los términos “que trata” o “tratamiento” o “trata” o “que alivia” o “alivia” se refiere a tanto 1) mediciones terapéuticas que curan, desaceleran, reducen los síntomas de

y/o detienen la progresión de una condición o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previene o desaceleran el desarrollo de una condición o trastorno patológico objetivo. De esta manera aquellas personas sin necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos a quienes el trastorno se va a prevenir. En algunas modalidades, un sujeto es exitosamente "tratado" de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o una ausencia de infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos incluyendo la propagación de células cancerosas en el tejido blando y huesos; inhibición de o una ausencia de metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibición o una ausencia del crecimiento canceroso; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbidez y mortalidad reducidas; mejora en la calidad de vida; reducción en la tumorigenicidad; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas; o alguna combinación de los efectos.

Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen formas plurales a menos que el contexto lo

indique claramente de otra manera.

Se entiende que donde las modalidades se describan en la presente con el lenguaje “que comprende” de otra manera las modalidades análogas descritas en los términos de “que consiste de” y/ “que consiste esencialmente de” también se proporcionan. También se entiende que donde las modalidades se describan en la presente con el lenguaje “que consiste esencialmente de” de otra manera las modalidades análogas descritas en los términos de “que consiste de” también se proporcionan.

El término “y/o” como se usa en la frase tal como “A y/o B” en la presente se propone incluir tanto A y B; A o B; A (sola); y B (sola). Del mismo modo el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B, y/o C” se propone para abarcar cada una de las siguientes modalidades: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (sola); B (sola); y C (sola).

II. Anticuerpos

La presente invención proporciona agentes que se ligan específicamente a las proteínas VEGF humanas y/o proteínas DLL4 humano. Estos agentes se refieren en la presente como “agentes de ligación a VEGF/DLL4”. La frase “agente de ligación a VEGF/DLL4” abarca a agentes que se ligan solamente de VEGF, agentes que se ligan solamente de DLL4, y agentes biespecíficos que se ligan tanto a VEGF como DLL4. En ciertas

modalidades, además de ligarse específicamente a VEGF y/o DLL4, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 se ligan específicamente además a por lo menos un objetivo o antígeno adicional. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un polipéptido. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga específicamente a VEGF humano. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga específicamente a DLL4 humano. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un biespecífico. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. Las secuencias de aminoácidos (aa) de longitud completa para el VEGF humano (VEGF-A) y DLL4 humano son conocidas en la técnica y se proporciona en la presente como SEQ ID NO:27 (VEGF) y SEQ ID NO:23 (DLL4).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1µM o menor, aproximadamente 100nM o menor, aproximadamente 40nM o menor, aproximadamente 20nM o menor, aproximadamente 10nM o menor, aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se ligan a VEGF y/o DLL4 con una K_D de

aproximadamente 20nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a tanto VEGF humano como VEGF de ratón con una K_D de aproximadamente 100nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga tanto a VEGF humano como VEGF de ratón con una K_D de aproximadamente 50nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a tanto DLL4 humano como DLL4 de ratón con una K_D de aproximadamente 100nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga tanto a DLL4 humano como a DLL4 de ratón con una K_D de aproximadamente 50nM o menor. En algunas modalidades, la constante de disociación del agente de ligación (por ejemplo, un anticuerpo) a VEGF es la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión VEGF que comprende por lo menos una porción del VEGF inmovilizado sobre un chip Biacore. En algunas modalidades, la constante de disociación del agente de ligación (por ejemplo, un anticuerpo) a DLL4 es

la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión DLL4 que comprende por lo menos una porción de DLL4 inmovilizado sobre un chip Biacore.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D de aproximadamente 100nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D de aproximadamente 20nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D of aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se liga tanto a VEGF como DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, la afinidad de uno de los sitios de ligación del antígeno puede ser más débil que la afinidad del otro sitio de ligación a antígeno. Por ejemplo, la K_D de un sitio de ligación a antígeno puede ser de aproximadamente 1nM y la K_D del segundo sitio de ligación a antígeno puede ser de

aproximadamente 10nM. En algunas modalidades, la diferencia en la afinidad entre los dos sitios de ligación a antígeno puede ser de aproximadamente 2 veces o más, de aproximadamente 3 veces o más, de aproximadamente 5 veces o más, de aproximadamente 8 veces o más, de aproximadamente 10 veces o más, de aproximadamente 15 veces o más, de aproximadamente 20 veces o más, de aproximadamente 30 veces o más, de aproximadamente 50 veces o más, o de aproximadamente 100 veces o más. La modulación de las afinidades de los sitios de ligación a antígeno puede afectar la actividad biológica del anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, la disminución de la afinidad del sitio de ligación a antígeno para DLL4 o VEGF, puede tener un efecto deseable, por ejemplo toxicidad disminuida del agente de ligación o índice terapéutico incrementado.

A manera de ejemplo no limitante, el anticuerpo biespecífico puede comprender (a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga a VEGF humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 1.0 nM, (b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 20 nM, entre aproximadamente 0.5nM y aproximadamente 20nM, entre aproximadamente 1.0 nM y 10nM. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga a VEGF y/o DLL4 con una concentración efectiva máxima media (EC_{50}) de aproximadamente 1µM o menor, de aproximadamente 100nM o menor, de aproximadamente 40nM o menor, de aproximadamente 20nM o menor, de aproximadamente 10nM o menor, de aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de ligación a antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es monovalente, monoespecífico, bivalente, o multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo se conjuga a una porción citotóxica. En algunas modalidades, el anticuerpo se aísla.

En algunas modalidades, el anticuerpo es sustancialmente puro.

Los agentes de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpos) de la presente invención se pueden someter a ensayo par ligación específica por cualquier método conocido en el campo. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como análisis Biacore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis Western blot, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo de “emparedado”, ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, y ensayo de fijación de complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente, ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogéneo (HTRF, por sus siglas en inglés), e inmunoensayo de proteína A. Tales ensayos son de rutina y bien conocidos en el campo (véase, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, Editors, 1994–present, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

Por ejemplo, la ligación específica de un anticuerpo a VEGF humano y/o DLL4 humano se puede determinar usando el ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtítulo de 96 pocillos con antígeno, agregar el anticuerpo u otro agente de

ligación conjugado a un compuesto detectable tal como un substrato enzimático (por ejemplo peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un período de tiempo, y detectar la presencia del agente de ligación ligado al antígeno. En algunas modalidades el agente de ligación o anticuerpo no se conjuga a un compuesto detectable, sino en cambio un segundo anticuerpo que reconoce el agente de ligación o anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-Fc) y se conjuga a un compuesto detectable se agrega al pocillo. En algunas modalidades, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el agente de ligación o anticuerpo se puede recubrir al pocillo y un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable se puede agregar después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Una persona de experiencia en el campo estaría bien informada en cuanto los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISAs conocidos en la técnica.

En otro ejemplo, la ligación especifica de un anticuerpo a VEGF humano y/o DLL4 humano se puede determinar usando el FACS. Un ensayo de clasificación FACS puede comprender generar un constructo de cADN que exprese un antígeno como una proteína de fusión, transfecte el constructo en las células, exprese el antígeno sobre la superficie de las células, mezcle el agente de ligación o anticuerpo con las

células transfectadas, e incube durante un período de tiempo. Las células ligadas por el agente de ligación o anticuerpo se pueden identificar al usar un anticuerpo secundario conjugado a un compuesto detectable. (Por ejemplo, anticuerpo anti-Fc conjugado con PE) y un citómetro de flujo. Una persona de experiencia en el campo estaría bien informado en cuanto a los parámetros que se pueden modificar para optimizar la señal detectada así como otras variaciones de FACS que pueden mejorar la clasificación (por ejemplo, clasificación para bloquear los anticuerpos).

La afinidad de ligación de un anticuerpo u otro agente de ligación a un antígeno (por ejemplo, VEGF o DLL4) y la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno se puede determinar por ensayos de ligación competitivos. Un ejemplo de un ensayo de ligación competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno etiquetado (por ejemplo, ^{3}H o ^{125}I), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades de incremento del antígeno no etiquetado seguido por la detección del anticuerpo ligado al antígeno etiquetado. La afinidad del anticuerpo para el antígeno y las constantes de disociación de ligación se puede determinar a partir de los datos por y el análisis gráfico de Scatchard. En algunas modalidades, el análisis cinético Biacore se usa para determinar la constante de asociación y disociación de

la ligación de los anticuerpos o agentes que se ligan a un antígeno (por ejemplo, VEGF o DLL4). El análisis cinético Biacore comprende analizar la ligación y la disociación de los anticuerpos de los chips con el antígeno inmovilizado (por ejemplo, VEGF o DLL4) sobre su superficie.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al VEGF humano, en donde el agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs del anticuerpo 219R45 (véase la Tabla 1). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una o más de las CDRs de 219R45, dos o más de las CDRs de 219R45, tres o más de las CDRs de 219R45, cuatro o más de las CDRs de 219R45, cinco o más de las CDRs de 219R45, o seis de las CDRs de 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF humano y VEGF de ratón.

Tabla 1

	219R45
HC CDR1	NYWMH (SEQ ID NO:17)
HC CDR2	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)
HC CDR3	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK

	219R45
	(SEQ ID NO:20)
LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al VEGF humano, en donde el agente de ligación a VEGF comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una

CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el agente de ligación a VEGF comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se

liga específicamente VEGF, en donde el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID

NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:49, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo de ligación a VEGF u otro agente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:7, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 0.01nM o menor. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del agente de ligación a VEGF se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del agente de ligación a VEGF para VEGF se altera. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a VEGF se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a VEGF se disminuye. En algunas modalidades, el agente de

ligación a VEGF se liga a VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga a VEGF humano y VEGF de ratón.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 219R45 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF es el anticuerpo 219R45.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 219R45.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF como un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a VEGF es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa con el epítopo en el VEGF ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF como el anticuerpo 219R45. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa con el epítopo en el VEGF ligado por el anticuerpo

219R45.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF inhibe la ligación de VEGF humano a VEGFR-1 o VEGFR-2. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga específicamente VEGF y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga específicamente VEGF e inhibe la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF se liga específicamente VEGF e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis de las CDRs del anticuerpo 21R79 (véase la Tabla 2). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R79, dos o más de las CDRs 21R79, tres o más de las CDRs 21R79, cuatro o más de las CDRs 21R79, cinco o más de las CDRs 21R79, o seis de las CDRs 21R79. En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una, dos , tres, cuatro, cinco, y/o seis de las

CDRs del anticuerpo (véase la Tabla 2). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R75, dos o más de las CDRs 21R75, tres o más de las CDRs 21R75, cuatro o más de las 21R75, cinco o más de las CDRs 21R75, o seis de las CDRs 21R75. En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente al DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs del anticuerpo 21R83 (véase la Tabla 2). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R83, dos o más de las CDRs 21R83, tres o más de las CDRs 21R83, cuatro o más de las CDRs 21R83, cinco o más de las CDRs 21R83, o seis de las CDRs de 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 humano y DLL4 de ratón.

Tabla 2

	21R79	21R75	21R83
HC CDR1	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)
HC CDR2	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)
HC CDR3	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)

	21R79	21R75	21R83
LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

En ciertas modalidades, la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo de ligación a DLL4 es una HC CDR1 mínima que comprende AYYIH (SEQ ID NO:79).

En algunas modalidades, el agente de ligación es un anticuerpo que se liga al DLL4 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada

que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena

pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10. En ciertas

modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:48, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo de ligación a DLL4 u otro agente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:6, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que

comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4

comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:56, y una cadena

ligera que comprende SEQ ID NO:8.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el agente de

ligación a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se liga específicamente DLL4, en donde el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID

NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende

una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:62, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente es un anticuerpo biespecífico.

En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:5, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de 25nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de 10nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 0.01nM o menor. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del agente de ligación a DLL4 se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad de agente de ligación a DLL4 para DLL4 se altera. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a DLL4 se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del agente de ligación a DLL4 se disminuye.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4

comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R79 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 es el anticuerpo 21R79.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R79.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R75 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 es el anticuerpo 21R75.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R75.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, el agente de ligación a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R83 (con o sin la secuencia líder). En ciertas modalidades, el agente de

ligación a DLL4 es el anticuerpo 21R83.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R83.

En algunas modalidades, un agente de ligación a DLL4 se liga a un fragmento N-terminal de DLL4 humano (aminoácidos 1-191 de SEQ ID NO:24). En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a un epítopo que comprende los aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a un epítopo que comprende los aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga a un epítopo que comprende los aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25 y los aminoácidos 113-120 d SEQ ID NO:25.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 as un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como el anticuerpo 21R79. En otra modalidad, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa

por el epítopo en DLL4 ligado por el anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como un anticuerpo 21R75. En otra modalidad, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por el anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como el anticuerpo 21R83. En otra modalidad, el agente de ligación a DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por el anticuerpo 21R83.

En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En ciertas modalidades, el receptor Notch es Notch1, Notch2, Notch3, o Notch4. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 e inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4

se liga específicamente DLL4 e inhibe la tumorigenicidad. En algunas modalidades, el agente de ligación a DLL4 se liga específicamente DLL4 y reduce el número de frecuencia de CSCs en un tumor.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente al VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga a un objetivo asociado al tumor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que

comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%,

por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga a un objetivo asociado a tumor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina,

asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende

YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID

NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) que se liga específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a

VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R79.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a

antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21M18.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R75.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico

comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R83.

En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64, y

una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena

ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena

ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable

de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una

región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21M18. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R79 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21M18 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una

región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R75 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R83 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio CH3 y un segundo dominio CH3, cada uno de los cuales se modifica para promover la formación de heteromultímeros. En algunas modalidades, el primero y segundo dominios CH3 se modifican usando una técnica de perillas en agujeros. En algunas modalidades, el primero y segundo dominios CH3 comprenden cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones electrostáticas alteradas. En algunas modalidades, el primero y segundo dominios CH3 comprenden cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas alteradas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende regiones constantes de cadena pesada seleccionado del grupo

que consiste de: (a) una primera región constante IgG1 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 253 y 292 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG1 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 240 y 282 se sustituyen con lisina; (b) una primera región constante IgG2 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 249 y 288 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 236 y 278 se sustituyen con lisina; (c) una primera región constante IgG3 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 300 y 339 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG3 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 287 y 329 se sustituyen con lisina; y (d) una primera región constante IgG4 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 250 y 289 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG4 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 237 y 279 se sustituyen con lisina.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG1 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 253 y 292, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG1 humana con sustituciones de aminoácido en las

posiciones 240 y 282, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG3 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 300 y 339, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 287 y 329, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG4 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 250 y 289, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG4 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 237 y 279, en donde los aminoácidos son lisina.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de

aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:5. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:56. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:62. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende además una cadena ligera de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID

NO:5, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:6, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:56, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:62, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 50nM o menor, aproximadamente 25nM o menor, aproximadamente 10nM o menor, aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50nM o menor, aproximadamente 25nM o menor, aproximadamente 10nM o menor, aproximadamente 1nM o menor, o aproximadamente 0.1nM o menor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 50nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50nM o menor.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 25nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 25nM o menor. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 10nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 10nM o menor. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga a VEGF con una K_D de aproximadamente 1nM o menor y se liga a DLL4 con una K_D de aproximadamente 1nM o menor.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno con una afinidad de ligación que es más débil que la afinidad de ligación del segundo sitio de ligación a antígeno. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM y puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM. O el anticuerpo biespecífico puede ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM y puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM y puede ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM. O el anticuerpo biespecífico puede ligarse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 1nM a 10nM y puede

ligarse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 0.1nM a 1nM en algunas modalidades, la diferencia en la afinidad entre los dos sitios de ligación a antígeno puede ser de aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 15 veces o más, aproximadamente 30 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, o aproximadamente 100 veces o más. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del sitio de ligación a antígeno para VEGF se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del sitio de ligación a antígeno se altera. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a VEGF se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a VEGF se disminuye. En algunas modalidades, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del sitio de ligación a antígeno para DLL4 se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del sitio de ligación a DLL4 se altera. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a DLL4 se incrementa. En algunas modalidades, la afinidad del sitio de ligación a DLL4 se disminuye. En algunas modalidades, las afinidades de los sitios de ligación a antígeno de tanto el VEGF como DLL4 se alteARNn.

La invención proporciona polipéptidos, que incluyen pero

no se limitan a anticuerpos, que se ligan específicamente a VEGF y/o DLL4. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a VEGF humano. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a DLL4 humano. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a VEGF humano y VEGF de ratón. En algunas modalidades, un polipéptido se liga a DLL4 humano y DLL4 de ratón.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49.

En algunas modalidades, un agente de ligación a DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ NO ID:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID

NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID

NO:64. En algunas modalidades, el agente de ligación VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) compite para la ligación específica a VEGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 compite con un anticuerpo 219R45 para la ligación específica a VEGF humano. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo compite para la ligación específica a VEGF en un ensayo de ligación específica competitiva. En algunas modalidades, el VEGF es VEGF humano. En algunas modalidades, el VEGF es VEGF de ratón.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF-DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF as un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa por el epítopo en VEGF ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en VEGF

como un anticuerpo 219R45. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en VEGF que se traslapa por el epítopo en VEGF ligado por anticuerpo 219R45.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF con el anticuerpo 219R45 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo).

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) compite para la ligación específica a DLL4 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R79 para la ligación específica a DLL4 humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R75 para la ligación específica a DLL4 humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R83 para la ligación específica a DLL4 humano. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo compite para la ligación específica a DLL4 en un ensayo de ligación específica competitiva. En algunas modalidades, el DLL4 es DLL4 humano. En algunas modalidades, el DLL4 es DLL4 de ratón.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por un anticuerpo de la invención. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga al mismo epítopo, o esencialmente al mismo epítopo, en DLL4 como anticuerpo 21R83. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por anticuerpo 21R79. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por anticuerpo 21R75. En otra modalidad, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a un epítopo en DLL4 que se traslapa por el epítopo en DLL4 ligado por anticuerpo 21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación

específica a DLL4 con el anticuerpo 21R79 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a DLL4 con el anticuerpo 21R75 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a DLL4 con el anticuerpo 21R83 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a DLL4 con el anticuerpo 21M18 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M79 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M75 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo). En ciertas modalidades, el agente de ligación a

VEGF/DLL4 es un agente que compite para la ligación específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M83 (por ejemplo, en un ensayo de ligación competitivo).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente se liga a VEGF y modula la actividad de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe la actividad de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe la angiogénesis. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente se liga a DLL4 humano y modula la actividad de DLL4. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de Notch. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la señalización Notch. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un

antagonista DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 y promueve la angiogénesis aberrante. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF humano y modula la actividad de VEGF. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente es un anticuerpo biespecífico que se liga a DLL4 humano y modula la actividad de DLL4. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF humano y DLL4 humano y modula la actividad tanto de VEGF como DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe la actividad tanto de VEGF como actividad de DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista de DLL4 e inhibe la actividad de VEGF y la actividad Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de VEGF y la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un

antagonista VEGF y un antagonista DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 y promueve la angiogénesis aberrante. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe angiogénesis. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un antagonista VEGF y un antagonista DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo o un anticuerpo biespecífico) es un antagonista de VEGF. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de VEGF e inhibe la actividad de VEGF. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la actividad VEGF por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es un anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico

219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad VEGF humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) es un antagonista de DLL4. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la actividad de DLL4 por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la

actividad de DLL4 humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la actividad de DLL4 humano es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) es un antagonista de la señalización Notch. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la señalización Notch por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo

menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico

219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de VEGF a VEGFR-1 o VEGFR-2. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es un anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 219R45. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo

menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la ligación de la proteína DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de DLL4 a Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95%. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a

por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de ligación a antígeno 21R83. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que inhibe la ligación de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de ligación a VEGF/DLL4 (o agente de ligación a VEGF/DLL4 candidato) inhibe el VEGF o afecta la angiogénesis

son conocidos en el campo. Los ensayos *in vitro* de angiogénesis incluyen pero no se limitan a, ensayos de proliferación de HUVEC, ensayos de formación de tubo de células endoteliales, ensayos de proliferación (o formación de brotes), ensayos de migración de células HUVEC, y ensayos de invasión. En algunas modalidades, las células en la presencia de VEGF y la presencia de un agente de ligación a VEGF/DLL4 se comparan a las células en presencia de VEGF sin el agente de ligación a VEGF/DLL4 presente, y se evalúan para efectos en la angiogénesis (o efectos biológicos asociados con la angiogénesis). Los ensayos *in vivo* de la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, ensayos de enchufe matrigel, ensayos de microcavidades corneales, y ensayos de membrana corioalantóica de pollo (CAM, por sus siglas en inglés).

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de ligación a VEGF/DLL4 (o agente de ligación a VEGF/DLL4 candidato) inhibe la activación o señalización Notch son conocidos en el campo. Por ejemplo, los ensayos reporteros de luciferasa, basados en células que usan un vector reportero TCF/Luc que comprende múltiples copias del dominio de ligación a TCF de cadena arriba de un gen reportero de luciferasa de luciérnaga se pueden usar para medir los niveles de señalización Notch *in vitro* (Gazit y colaboradores, 1999, *Oncogene,* 18; 5959-66; TOPflash, Millipore, Billerica MA). En algunas modalidades, un ensayo

reportero de luciferasa, basado en células que usa un vector reportero a CBF/Luc que contiene múltiples copias del dominio de ligación a CBF de cadena arriba de los genes reporteros de luciferasa de luciérnaga se pueden usar. El nivel de la señalización Notch en presencia de uno o más ligandos Notch (por ejemplo, DLL4 expresado sobre la superficie de células transfectadas o proteína de fusión DLL4-Fc soluble) y en presencia de un agente de ligación a VEGF/DLL4 se compara con el nivel de la señalización Notch sin el agente de ligación a VEGF/DLL4 presente.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células tumorales, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, desencadenar la muerte celular de células tumorales, prevenir la metástasis de células tumorales, disminuir la supervivencia de las células tumorales, modular la angiogénesis, inhibir la angiogénesis, inhibir la angiogénesis productora, o promover la angiogénesis aberrante.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* (por

ejemplo, en un modelo de ratón de xenoinjerto, y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas modalidades, el crecimiento tumoral se inhibe por lo menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces como es comparado con un tumor no tratado.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de reducir la tumorigenicidad de un tumor. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, tal como un modelo de xenoinjerto de ratón. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor al disminuir el número o frecuencia de células madre cancerosas en el tumor. En ciertas modalidades, el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se reduce por lo menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces. En ciertas modalidades, la reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas se determina al limitar el ensayo de dilución usando un modelo animal. Ejemplos adicionales y guía con

respecto al uso para limitar los ensayos de dilución para determinar una reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se puede encontrar, por ejemplo, en el Número de Publicación Internacional WO 2008/042236; Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0064049; y Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0178305.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de modular la angiogénesis. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de modular la angiogénesis *in vivo* (por ejemplo, en un modelo de ratón de xenoinjerto, y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir la angiogénesis. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de promover la angiogénesis aberrante. En ciertas modalidades, Los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir la angiogénesis y/o promover la angiogénesis aberrante, conduciendo a vascularización no productiva.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente tiene una vida media circulante en ratones, monos cynomolgus, o humanos de por lo menos aproximadamente 2 horas, por lo menos aproximadamente 5 horas, por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 3 días, por lo menos aproximadamente 1 semana, o por lo menos

aproximadamente 2 semanas. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG2) que tiene una vida media circulante en ratones, monos cynomolgus, o humanos de por lo menos aproximadamente 2 horas, por lo menos aproximadamente 5 horas, por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 3 días, por lo menos aproximadamente 1 semana, o por lo menos aproximadamente 2 semanas. Los métodos para incrementar (o disminuir) la vida media de agentes tales como polipéptidos y anticuerpos son conocidos en el campo. Por ejemplo, los métodos conocidos para incrementar la vida media circulante de los anticuerpos IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc que incrementa la ligación dependiente de pH del anticuerpo al receptor Fc neonatal (FcRn) en pH 6.0 (véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente de E.U.A. Nos. 2005/0276799, 2007/0148164, y 2007/0122403). Métodos conocidos para incrementar la vida media circulante de fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc incluyen tales técnicas como PEGilación.

En algunas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son anticuerpos. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido. En algunas modalidades, los anticuerpos policlonales se producen al inmunizar un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón,

cabra, burro) con unan un antígeno de interés (por ejemplo, un fragmento de péptido purificado, proteína recombinante de longitud completa, o proteína de fusión por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El antígeno se puede conjugar opcionalmente a un portador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) o albúmina de suero. El antígeno (con o sin una proteína portadora) se diluye en solución salina estéril y se combina usualmente con un adyuvante (por ejemplo, Adyuvante de Freund Completo o Incompleto) para formar una emulsión estable. Después de un breve de tiempo suficiente, los anticuerpos policlonales se recubren del animal inmunizado, usualmente de sangre o ascitis. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar de suero o ascitis de acuerdo con los métodos estándares en el campo incluyendo, pero no limitado a, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio de iones, electroforesis en gel y diálisis.

En algunas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma conocidos por una persona de experiencia en el campo (véase por ejemplo, Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497). En algunas modalidades, el uso del método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal hospedero apropiado, se inmuniza como se describe en lo anterior para inducir de los

linfocitos la producción de anticuerpos que se ligan específicamente al antígeno de inmunización. En algunas modalidades, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. En algunas modalidades, el antígeno de inmunización puede ser una proteína humana o una porción de la misma. En algunas modalidades, el antígeno de inmunización puede ser una proteína de ratón o una porción de la misma.

Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea de células de mieloma adecuadas, usando, por ejemplo, polietilenglicol. Las células de hibridoma se seleccionan usando medios especializados como son conocidos en el campo y los linfocitos no fusionados y las células de mieloma no sobreviven al proceso de selección. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos contra específicamente un antígeno elegido se puede identificar por una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, inmunoprecipitación, inmunotinción, y ensayos de ligación *in vitro* (por ejemplo, citometría de flujo, FACS, ELISA, y radioinmunoensayo). Los hibridomas se pueden propagar ya sea en cultivo *in vitro* usando métodos estándares (J.W. Goding, 1996, *Anticuerpos monoclonales: Principles and Practice*, *3ª Edición*, Academic Press, San Diego, CA) o *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar del medio de cultivo o fluido ascítico de acuerdo con los métodos estándares en la

técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, y diálisis.

En ciertas modalidades, anticuerpos monoclonales se pueden elaborar usando técnicas de ADN recombinantes como es conocido por una persona experta en el campo. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y su secuencia se determina usando técnicas estándares. Los polinucleótidos aislados que codifican loas cadenas pesadas y ligeras luego se clonan en vectores de expresión adecuados que producen los anticuerpos monoclonales cuando se transfectan en células hospederas tales como E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), o células de mieloma que de otra manera no producen proteínas de inmunoglobulina.

En ciertas otras modalidades, los anticuerpos monoclonales recombinantes, o fragmentos de los mismos, se pueden aislar de bibliotecas de expresión en fago que expresan dominios variables o CDRs de una especie deseada (véase por ejemplo, McCafferty y colaboradores, 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson y colaboradores, 1991, *Nature*, 352:624-

628; y Marks y colaboradores, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

El polinucleótido(s) que codifica un anticuerpo monoclonal se puede modificar, por ejemplo, al usar tecnología de ADN recombinante para genera anticuerpos alternativos. En algunas modalidades, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden sustituir para esas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico, o para un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas modalidades, las regiones constantes se truncan o remueven para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable se puede usar para utilizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal contra VEGF y/o DLL4 es un anticuerpo humanizado. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las CDRs se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tienen la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación usando métodos conocidos por una persona experta en el campo. En algunas modalidades,

los residuos de región de estructura Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de ligación. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad del anticuerpo, afinidad y/o capacidad. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos una, y típicamente dos tres, regiones de dominio variables que contienen todas o sustancialmente todas, de las CDRs que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, de las regiones de estructuras son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. En ciertas modalidades, tales anticuerpos humanizados se usan terapéuticamente debido a que pueden reducir la antigenicidad y respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administra a un sujeto humano. Una persona experta en el campo sería capaz de obtener un anticuerpo humanizado

funcional con inmunogenicidad reducida siguiendo las técnicas conocidas (véase por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; y 5,693,762).

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar directamente usando varias técnicas conocidas en el campo. En algunas modalidades, los anticuerpos humanos se pueden generar de linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o de linfocitos aislados de un individuo inmunizado. En cualquier caso, las células que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo se pueden generar y aislar (véase, por ejemplo, Cole y colaboradores, 1985, *Anticuerpos monoclonales and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer y colaboradores, 1991, *J. Immunol.*, 147:86-95; y Patentes de E.U.A. Nos. 5,750,373; 5,567,610; y 5,229,275). En algunas modalidades, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca en fago, donde la biblioteca en fago expresa anticuerpos humanos (Vaughan y colaboradores, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y colaboradores, 1998, *PNAS,* 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.,* 227:381; Marks y colaboradores, 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581). Alternativamente, la tecnología de expresión en fago se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variables de inmunoglobulina

de donadores inmunizados. Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas en fago de anticuerpos también se describen en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe y colaboradores, 2008, *J. Mol. Bio.*, 376:1182-1200. Una vez que los anticuerpos se identifican, las estrategias de maduración por afinidad conocidas en el campo incluyendo pero no limitado a, transposición de cadena (Marks y colaboradores, 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783) y mutagénesis dirigida al sitio, se pueden emplear para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

En algunas modalidades, los anticuerpos humanos se pueden hacer en ratones transgénicos que contienen sitios de inmunoglobulina humana. En la inmunización estos ratones son capaces de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este procedimiento se describe en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

Esta invención también abarca anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son capaces de reconocer y ligar específicamente por lo menos dos antígenos o epítopos diferentes. Los epítopos diferentes pueden estar ya sea dentro de la misma molécula (por ejemplo, dos epítopos en una

sola proteína) o en diferentes moléculas (por ejemplo, un epítopo en una proteína y un epítopo en una segunda proteína). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene potencia mejorada como es comparado con un anticuerpo individual o una combinación de más de un anticuerpo. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene toxicidad reducida como es comparado con un anticuerpo individual o a una combinación de más de un anticuerpo. Es conocido por aquellas personas de experiencia en el campo que cualquier agente de ligación (por ejemplo, anticuerpo) puede tener farmacocinética única (PK) (por ejemplo, línea media circulante). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de sincronizar la PK de dos agentes de ligación activos en donde los dos agentes de ligación individuales tienen diferentes perfiles de PK. En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de concentrar las acciones de dos agentes de ligación (por ejemplo, anticuerpos) en un área común (por ejemplo, un tumor y/o entorno de tumor). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de concentrar las acciones de dos agentes de ligación (por ejemplo, anticuerpos) a un objetivo común (por ejemplo, un tumor o una célula tumoral). En algunas modalidades, un anticuerpo biespecífico tienen la capacidad de fijar como objetivo las acciones de dos agentes de ligación (por

ejemplo, anticuerpos) a más de una ruta o función biológica.

En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF y un segundo objetivo. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a DLL4 y un segundo objetivo. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano monoclonal o humano humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico inhibe la angiogénesis y reduce el número o frecuencia de células madre cancerosas. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos e inhibe la maduración de vasos sanguíneos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico previene la hiperproliferación endotelial. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene toxicidad disminuida y/o efectos secundarios. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene toxicidad disminuida y/o efectos secundarios como es comparado con una mezcla de los dos anticuerpos individuales o los anticuerpos como agentes individuales. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico tiene un índice terapéutico incrementado. En algunas modalidades, el anticuerpo

biespecífico tiene un índice terapéutico incrementado como es comparado con una mezcla de los dos anticuerpos individuales o los anticuerpos como agentes individuales.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede reconocer específicamente y ligarse a un primer objetivo de antígeno, (por ejemplo, DLL4) así como un segundo objetivo de antígeno, tal como una molécula efectora en un leucocito (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7) o un receptor Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celulares a la célula que expresa el primer objetivo de antígeno. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para dirigir los agentes de citotoxicidad a las células que expresan un antígeno objetivo particular. Estos anticuerpos poseen un sitio de ligación a antígeno (por ejemplo, a DLL4 humano) y un segundo sitio que se liga a un agente citotóxico o un quelante de radionucleídos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA.

Las técnicas para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidas por aquellas personas expertas en el campo, véase por ejemplo, Millstein y colaboradores, 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan y colaboradores, 1985, *Science*, 229:81; Suresh y colaboradores, 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Traunecker y colaboradores, 1991, *EMBO J.,* 10:3655-3659; Shalaby y colaboradores, 1992, *J. Exp. Med.,* 175:217-225; Kostelny y colaboradores, 1992, *J. Immunol.,* 148:1547-1553;

Gruber y colaboradores, 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; Patente de E.U.A. No. 5,731,168; Publicación Internacional No. WO 2009/089004; y Publicación de Patente de E.U.A. No. 2011/0123532. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos comprenden regiones constantes de cadena pesada o modificaciones en los aminoácidos que son parte de la interface entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar usando una estrategia de “perillas en agujeros” (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 5,731,168; Ridgway y colaboradores, 1996, *Prot. Engin.*, 9:617-621). Algunas veces la terminología de “perillas” y “agujeros” se reemplaza con los términos “protuberancias” y “cavidades”. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden comprender regiones bisagra variantes incapaces de formar ligaciones de disulfuro entre las cadenas pesadas (véase, por ejemplo, WO 2006/028936). En algunas modalidades, las modificaciones pueden comprender cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones electrostáticas alteradas. En algunas modalidades, las modificaciones pueden comprender cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas alteradas.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmento de anticuerpo que comprende sitios de ligación a antígeno. Los anticuerpos con más de dos valencias

también se contemplan. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparan (Tutt y colaboradores, 1991, *J. Immunol.*, 147:60). De esta manera, en ciertas modalidades los anticuerpos a VEGF y/o DLL4 son multiespecíficos.

En ciertas modalidades, los anticuerpos (u otros polipéptidos) descritos en la presente pueden ser monoespecíficos. En ciertas modalidades, cada uno del uno o más sitios de ligación a antígeno que un anticuerpo contiene es capaz de ligarse (o ligarse) a un epítopo homólogo en diferentes proteínas.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden tener diferentes funciones o capacidades que los anticuerpos intactos; por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden tener penetración incrementada del tumor. Varias técnicas son conocidas para la producción de los fragmentos de anticuerpo incluyendo, pero no limitado a, digestión proteolítica de anticuerpos intactos. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento F(ab')2 producido por la digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')2. En otras modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula

de anticuerpo con papaína y un agente reductor. En ciertas modalidades, los fragmentos de anticuerpo se producen recombinantemente. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo incluyen Fv o fragmentos de Fv de cadena individual (scFv). Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, y scFv se pueden expresar en y secretar de E. coli u otras células hospederas, permitiendo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo se aíslan de las bibliotecas de fago de anticuerpos como se plantea en la presente. Por ejemplo, los métodos se pueden usar para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse y colaboradores, 1989, *Science*, 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para VEGF y/o DLL4 o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. En algunas modalidades, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de anticuerpo lineales. En ciertas modalidades, los fragmentos de anticuerpo son monoespecíficos o biespecíficos. En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un scFv. Se pueden usar varias técnicas para la producción de anticuerpos de cadena individual específicos a VEGF o DLL4 (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4,946,778).

Además puede ser deseable, especialmente en el caso de los fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo a fin

de alterar (por ejemplo, incrementar o disminuir) su vida media en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de ligación a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o al incorporar el epítopo en una etiqueta de péptido que luego se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte intermedia (por ejemplo, por síntesis de ADN o péptidos).

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para fijar como objetivo células inmunes a células no deseadas (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4,676,980). También se contempla que los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteína sintética, incluyendo aquellas que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir usado una reacción de intercambio de disulfuro o al formar una ligación de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Para los propósitos de la presente invención, se debe apreciar que los anticuerpos modificados pueden comprender

cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con el objetivo (es decir, VEGF humano o DLL4 humano). En este aspecto, la región variable puede comprender o ser derivado de cualquier tipo de mamífero que se pueda inducir a totalizar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o de origen de conejo. En algunas modalidades, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras modalidades, las regiones variables de los anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente no humana) se pueden diseñar o adaptar específicamente para mejorar las propiedades de ligación o para reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este aspecto, las regiones variables útiles en la presente invención se pueden humanizar o alterar de otra manera a través de la inclusión de secuencias de aminoácido importadas.

En ciertas modalidades, los dominios variables en tanto las cadenas pesadas como ligeras se alteran por el reemplazo o por lo menos parcial de una o más CDRs y, si es necesario, por el reemplazo de la región de estructura parcial y la modificación y/o alteración de secuencia. Aunque las CDRs se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o aún

subclase como el anticuerpo del cual las regiones de estructura se derivan, se prevé que las CDRs se pueden derivar de un anticuerpo de diferente clase y frecuentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDRs con todas las CDRs de una región variable donadora para transferir la capacidad de ligación a antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede ser solo necesario transferir esos residuos que son requeridos para mantener la actividad del sitio de ligación a antígeno.

Las alteraciones a la región variable no obstante, aquellos expertos en el campo apreciarán que los anticuerpos modificados de esta invención comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunoreactivos de los mismos) en los cuales por lo menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han detectado o de otra manera alterado para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como localización incrementada de tumor o vida media de suero incrementada cuando se compara con anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante relativa o inalterada. En algunas modalidades, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatible con esta invención comprenden adiciones, supresiones o

sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Los anticuerpos modificados dados a conocer en la presente pueden contener alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En algunas modalidades, uno o más dominios se suprimen parcial o completamente de las regiones constantes de los anticuerpos modificados. En algunas modalidades, los anticuerpos modificados comprenderán constructos o variantes suprimidos de dominio en donde el dominio CH2 completo se ha removido (constructos ΔCH2). En algunas modalidades, el dominio de región constante omitido se reemplazó por un espaciador de aminoácido corto (por ejemplo, residuos de 10 aminoácidos) que proporcionan algo de la flexibilidad molecular impartida típicamente por la región constante ausente.

En algunas modalidades, los anticuerpos modificados se diseñan para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra del anticuerpo. En otras modalidades, un espaciador de péptido se inserta entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, los constructos se pueden expresar en donde el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Tal espaciador se puede agregar para asegura que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que

la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, cabe destacar que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, probar ser inmunogénicos e inducen una respuesta inmune indeseada contra el constructo. Por consiguiente, en ciertas modalidades, cualquier espaciador agregado al constructo será relativamente no inmunogénico para mantener las calidades biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

En algunas modalidades, los anticuerpos modificados pueden tener solamente una supresión parcial de un dominio o sustitución constante de pocos o aún un aminoácido individual. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en las áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la ligación de Fc e incrementar en consecuencia la localización de la célula cancerosa y/o penetración del tumor. Similarmente, puede ser deseable simplemente suprimir la parte de uno o más dominios de región constante que controlan una función efectora específica (por ejemplo ligación de C1q de complemento) que se modula. Tales supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) mientras que dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante sujeto. Por otra parte, como se alude en o anterior, las regiones constantes de los anticuerpos

divulgados y dados a conocer se pueden modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil del consultor resultante. En este aspecto puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de ligación conservado (por ejemplo, ligación a Fc) mientras que mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. En ciertas modalidades, los anticuerpos modificados comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables tal como disminuir o incrementar la función efectora y proporcionar más sitios de unión de citotoxina o carbohidratos.

Es conocido en el campo que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la ligación del componente C1 del complemento a la región Fc de los anticuerpos IgG o IgM (ligados al antígeno) activa el sistema complementario. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también activa la respuesta inflamatoria y también se puede aplicar en la hipersensibilidad autoinmune. Además, la región Fc de un anticuerpo puede ligarse a una respuesta que expresa un receptor Fc (FcR). Existe una variedad de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon),

IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La ligación del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una variedad de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo el agobio y destrucción de las partículas recubiertas con anticuerpo, eliminación de los complejos inmunes, lisis de las células objetivo recubiertas con anticuerpo por células exterminadoras (llamado citotoxicidad de células dependientes de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina.

En ciertas modalidades, los anticuerpos modificados proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, en algunas modalidades, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la ligación del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de esta manera la localización de células cancerosas y/o penetración del tumor. En otras modalidades, las modificaciones de la región constante incrementan la vida media en suero del anticuerpo. En otras modalidades, las modificaciones de región constante reducen la vida media en suero del anticuerpo. En algunas modalidades, la región constante se modifica para eliminar las ligaciones de disulfuro o porciones de oligosacáridos. Las modificaciones a

la región constante de acuerdo con esta invención se pueden hacer fácilmente usando técnicas de ingeniería bioquímica molecular bien conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo.

En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo no tiene actividad de ADCC, y/o ninguna actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En ciertas modalidades, el anticuerpo no se liga a un receptor Fc, y/o factores de complemento. En ciertas modalidades, el anticuerpo no tiene una función efectora.

La presente invención abarca además variantes equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, expuestos en la presente. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustituciones conservadoras, es decir la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se propone para una sustitución de aminoácido

conservadora es bien conocido en el campo y se describe en la presente.

De esta manera, la presente invención proporciona métodos para producir un anticuerpo que se liga a VEGF y/o DLL4, incluyendo anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente a tanto VEGF como DLL4. En algunas modalidades, el método para producir un anticuerpo que se liga a VEGF y/o DLL4 comprende el uso de técnicas de hibridoma. En algunas modalidades, el método para generar un anticuerpo que se liga a VEGF o DLL4 o un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4 comprende la clasificación de una biblioteca en fago humana. La presente invención proporciona además métodos para identificar un anticuerpo que se liga a VEGF y/o DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para ligarse a VEGF o una porción del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para ligarse a DLL4 o una porción del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación de FACS para ligarse tanto a VEGF como a DLL4 o una porción de los mismos. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando ELISA para la ligación a VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando el ELISA para la ligación a DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la

clasificación usando el ELISA para ligarse a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para el bloqueo de la ligación de VEGF humano a un receptor VEGF humano. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para el bloqueo de la ligación de DLL4 humano a un receptor Notch humano. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la inhibición o bloqueo de la señalización Notch. En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la inhibición o bloqueo de la actividad de VEGF (por ejemplo, inducción de proliferación de HUVEC). En algunas modalidades, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la modulación del angiogénesis.

En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo VEGF humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende los aminoácidos 27-232 de VEGF humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo a VEGF humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano. En algunas modalidades, el método comprende además aislar los anticuerpos o células productoras de anticuerpos del mamífero. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se liga a VEGF comprende: inmunizar un mamífero con un

polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano, y aislar las células productoras de anticuerpos del mamífero inmunizado. En algunas modalidades, el método comprende además fusionar las células productoras de anticuerpos con células de una línea de células de mieloma para formar células de hibridoma. En algunas modalidades, el método el método comprende además seleccionar una célula de hibridoma que expresa un anticuerpo que se liga al VEGF. En ciertas modalidades, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, el anticuerpo se selecciona usando un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano.

En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo al DLL4 humano comprende inmunizar un mamífero con una polipéptido que comprende los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo al DLL4 humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se liga a DLL4 comprende: inmunizar un mamífero con una polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano, y aislar las células productoras del anticuerpo del mamífero inmunizado. En algunas modalidades, el método comprende además fusionar las células productoras

de anticuerpos con células de una línea de células de mieloma para formar células de hibridoma. En algunas modalidades, el método comprende además seleccionar una célula de hibridoma que expresa un anticuerpo que se liga a DLL4. En ciertas modalidades, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, el anticuerpo se selecciona usando un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano.

En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo a VEGF humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos que se ligan a VEGF humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo DLL4 humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos que se ligan al DLL4 humano. En algunas modalidades, un método para generar un anticuerpo al VEGF humano y/o al DLL4 humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos biespecíficos que se ligan al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, la biblioteca de expresión de anticuerpos es una biblioteca de fagos. En algunas modalidades, la clasificación comprende inmunoplaqueteo. En algunas modalidades, la biblioteca de expresión de anticuerpos (por ejemplo, una biblioteca de fagos) se clasifica usando por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano. En algunas modalidades, los

anticuerpos identificados en la primera clasificación, se clasifican contra el uso de por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano para identificar un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, la biblioteca de expresión de anticuerpos (por ejemplo, una biblioteca de fagos) se clasifica usando por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas modalidades, los anticuerpos identificados en la primera clasificación, se clasifican contra el uso de por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano para identificar un anticuerpo biespecífico que liga a VEGF y DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en las clasificaciones es un antagonista VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación inhibe las actividades biológicas inducidas por VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación es un antagonista DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación inhibe la señalización Notch inducida por DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación se liga tanto al VEGF humano como el VEGF de ratón. En algunas modalidades, el anticuerpo identificado en la clasificación se liga a tanto el DLL4 humano como el DLL4 de ratón.

En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente se aíslan. En ciertas modalidades, los anticuerpos

descritos en la presente son sustancialmente puros.

En algunas modalidades de la presente invención, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 son polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se ligan a VEGF y/o DLL4. Se reconocerá en el campo que algunas secuencias de aminoácidos de los agentes de ligación descritos en la presente se pueden variar sin efecto significativo en la estructura o función de la proteína. De esta manera, la invención incluye además variaciones d los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra el VEGF humano y/o DLL4 humano. En algunas modalidades, las variaciones de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ligación a VEGF/DLL4 incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y/u otros tipos de sustituciones.

En algunas modalidades, los polipéptidos descritos en la presente se aíslan. En algunas modalidades, los polipéptidos descritos en la presente son sustancialmente puros.

Los polipéptidos, análogos y variantes de los mismos, se pueden modificar adicionalmente para contener porciones químicas adicionales no normalmente parte del polipéptido. Las porciones derivadas pueden mejorar o de otra manera modular la solubilidad, la vida media biológica, y/o

absorción del polipéptido. Las porciones también pueden reducir o eliminar los efectos secundarios indeseables de los polipéptidos y variantes. Un estudio general para las pociones químicas se puede encontrar en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *21ª Edición*, 2005, University of the Sciences, Filadelfia, PA.

El polipéptidos descrito en la presente se puede producir mediante cualquier método adecuado conocido en el campo. Tales métodos varían de métodos de síntesis de proteínas directos para construir una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos y que expresa esa secuencia en un hospedero adecuado. En algunas modalidades, una secuencia de ADN se construye usando tecnología recombinante al aislar o al sintetizar una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véase, por ejemplo, Zoeller y colaboradores, 1984, *PNAS,* 81:5662-5066 y Patente de E.U.A. No. 4,588,585.

En algunas modalidades, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se puede construir por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se pueden diseñar basados en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y al

seleccionar esos codones que son favorecidos en la célula hospedera en la cual el polipéptido recombinante de interés se producirá. Métodos estándares se pueden aplicar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos completa se puede usar para construir un gen de nuevo traducido. Además, un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular se puede sintetizar. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones de polipéptido deseado se pueden sintetizar y luego ligar. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente terminales 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio, u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido particular de interés se puede insertar en un vector de expresión y ligar operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para expresión de la proteína en un hospedero deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar por la secuenciación de nucleótidos, mapeo de enzimas de restricción, y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedero adecuado. Como se conoce bien en el campo, a fin de obtener niveles de expresión alta de un gen transfectado en un hospedero, el gen se debe ligar operativamente a la

secuencia de control de expresión transcripcionales y/o traduccionales que son funcionales en el hospedero de expresión elegido.

En ciertas modalidades, los vectores de expresión recombinantes se usan para amplificar y expresar los anticuerpos que codifican ADN, o fragmentos de los mismos, contra el VEGF y/o DLL4 humanos. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes pueden ser constructos de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN derivados de cADN sintéticos que codifican una cadena de polipéptidos de un agente de ligación a VEGF/DLL4, tal como un anticuerpo anti-VEGF o un anticuerpo anti-DLL4, o un fragmento del mismo, ligados operativamente a un elementos reguladores transcripcionales y/o traduccionales adecuados derivados de genes de mamífero, microbiano, virales, o de insecto. Una unidad transcripcional comprende generalmente un ensamblaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o de codificación que se transcribe en mARN y se traduce en proteína, y (3) secuencias de inicio y terminación de transcripción y traducción apropiadas. Los elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad de replicaciones en un hospedero, usualmente conferido por un

origen de replicación, y un gene de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están “operativamente ligadas” cuando se relacionan funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido de señal (líder secretor) se liga operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como un percusor el cual participa en la secreción del polipéptido; un promotor se liga operativamente a una secuencia de codificación si controla una transcripción de la secuencia; o un sitio de ligación a ribosoma se liga operativamente a una secuencia de codificación y se coloca para permitir la traducción. En algunas modalidades, los elementos estructurales propuestos para el uso en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedera. En otras modalidades, en situaciones donde la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Esto residuo se puede escindir de manera opcional subsecuentemente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de una secuencia de control de expresión y un vector de expresión depende de la elección del hospedero. Una pre-variedad de combinaciones de hospedero/vector de expresión se pueden emplear. Los vectores de expresión útiles

para los hospederos eucarióticos incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospederos bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de E. coli incluyendo pCR1, pBR322, pMB9, y sus derivados, y plásmidos de intervalo de hospedero más amplios, tal como M13 y otros fagos de ADN de hebra individual filamentosos.

Los agentes de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, polipéptidos) de la presente invención se pueden expresar de uno o más vectores. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido de cadena pesada se expresa por un vector, un segundo polipéptido de cadena pesada se expresa por un segundo vector y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un tercer vector. En algunas modalidades, un primer polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un vector y un segundo polipéptido de cadena pesada se expresa por un segundo vector. En algunas modalidades, los polipéptidos de cadena pesada se expresan por un vector y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un segundo vector. En algunas modalidades, tres polipéptidos se expresan de un vector. De esta manera, en algunas modalidades, un primer polipéptido de cadena pesada, un segundo polipéptido de cadena pesada, y un polipéptido de

cadena ligera se expresan por un vector individual.

Células hospederas adecuadas para la expresión de un polipéptido o anticuerpo de ligación a VEGF/DLL4 (o una proteína de VEGF o DLL4 para el uso como un antígeno) incluyen procariotas, células de levadura, células de insecto, o células eucarióticas superiores bajo el control de los promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo E. coli o Bacillus. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas de células establecidas de origen de mamífero como se describe a continuación. Los sistemas de traducción sin células también se emplean. Los vectores de clonación y expresión apropiados para el uso con hospederos celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen en Pouwels y colaboradores, 1985, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, NY. La información adicional con respecto a los métodos de producción de proteínas, incluyendo producción de anticuerpos, se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0187954; Patentes de E.U.A. Nos. 6,413,746; 6,660,501; Publicación de Patente Internacional No. WO 04/009823.

Varios sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto se pueden usar para expresar polipéptidos recombinantes. La expresión de proteínas recombinantes en

células de mamífero puede ser deseable debido a que estas proteínas esta generalmente de manera correcta plegadas, apropiadamente modificadas y biológicamente funcionales. Ejemplos de líneas de células hospederas de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, líneas de células COS-7 (derivadas de reunión de monos), L-929 (derivadas de fibroblastos de murino), C127 (derivadas de tumor mamario de murino) 3T3 (derivadas de fibroblasto de murino), CHO (derivadas de ovario de hámster Chino), HeLa (derivadas de cáncer cervical humanos), BHK (derivadas de fibroblasto de riñón de hámster), HEK-293 (derivadas de riñón embriónico humano) y variantes de estas líneas de células. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados ligados al gen que se expresa, y otra secuencia no transcrita de flanqueo 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitio de ligación a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores de empalme y aceptores, y secuencia de terminación transcripcionales. La expresión de proteína recombinante en baculovirus también ofrece un método sólido para producir proteínas correctamente plegadas y biológicamente funcionales. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son bien conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo

(véase, por ejemplo, Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

De esta manera, la presente invención proporciona células que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En algunas modalidades, las células producen los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo. En algunas modalidades, las células producen un agente de ligación a VEGF, tal como un anticuerpo anti-VEGF. En algunas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF. En algunas modalidades, las células producen un agente de ligación a DLL4, tal como un anticuerpo anti-DLL4. En algunas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que se liga a DLL4. En ciertas modalidades, las células producen un agente de ligación a VEGF/DLL4 biespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo

biespecífico que comprende un sito de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21M18. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En ciertas modalidades, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas modalidades, las células producen el anticuerpo

biespecífico 219R45-MB-21R83.

Las proteínas producidas por un hospedero transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Los métodos estándares incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tal como hexa-histidina, dominio de ligación a maltosa, secuencia de recubrimiento de influenza, y glutationa-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir la fácil purificación por el pasaje sobre una columna de afinidad apropiada. La cromatografía de afinidad usada para la purificar inmunoglobulinas puede incluir cromatografía de Proteína A, Proteína G y Proteína L. las proteínas aisladas se pueden caracterizar físicamente usando tales técnicas como proteólisis, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), enfoque isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés), y cristalografía de rayos X. La pureza de las proteínas aisladas se pueden determinar usando técnicas conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo, incluyendo pero no limitado a, SDS-PAGE, SEC, electroforesis

en gel capilar, IEF, y enfoque isoeléctrico capilar (cIEF).

En algunas modalidades, los sobrenadantes del sistema de expresión que secretan proteína recombinante en los medios de cultivo primero se pueden concentrar usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultra filtración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el material concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. En algunas modalidades, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo pendientes (DEAE). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. En algunas modalidades, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. En algunas modalidades, se puede emplear un medio de hidroxiapatita, incluyendo pero no limitado a, hidroxiapatita de cerámica (CHT). En ciertas modalidades, una o más etapas de HPLC de fase inversa que emplea un medio RP-HPLC hidrofóbico, por ejemplo, gel de sílice que tienen grupos metilo pendientes u otros alifáticos, se pueden emplear para purificar adicionalmente una proteína recombinante (por ejemplo, un agente de ligación a VEGF/DLL4). Algo o todo de las etapas de purificación

anteriores, en varias combinaciones, se pueden emplear para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

En algunas modalidades, las proteínas heterodiméricas tales como anticuerpos biespecíficos se purifican de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se aíslan y/o purifican usando por los menos una etapa de cromatografía. En algunas modalidades, la por lo menos una etapa de cromatografía comprende cromatografía de afinidad. En algunas modalidades, la por lo menos una etapa de cromatografía comprende además cromatografía de intercambio aniónico. En algunas modalidades, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende por lo menos 90% de anticuerpo heterodimérico. En algunas modalidades, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de anticuerpo heterodimérico. En algunas modalidades, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende aproximadamente 100% de anticuerpo heterodimérico.

En algunas modalidades, la proteína recombinante producida en el cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, por extracción inicial de pelotillas de células, seguido por una o más de etapas de cromatografía de concentración, de salación, de intercambio de iónico a acuoso, o exclusión de tamaño. La HPLC se puede emplear para

etapas de purificación final. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden alterar por cualquier método conveniente, incluyendo ciclado de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisado celular.

Los métodos conocidos en el campo para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en las Publicación de Patentes de E.U.A. Nos. 2008/0312425; 2008/0177048; y 2009/0187005.

En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un polipéptido que no tiene un anticuerpo. Una variedad de métodos para identificar y producir polipéptidos no de anticuerpos que se ligan con alta afinidad a un objetivo de proteínas son objetivos en el campo. Véase, por ejemplo, Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse y colaboradores, 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill y colaboradores, 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; y Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83. En ciertas modalidades, la tecnología de expresión en fago o células de mamífero se pueden usar para producir e/o identificar un polipéptido de ligación a VEGF/DLL4 que no es un anticuerpo. En ciertas modalidades, el polipéptido comprende un andamio de proteínas de un tipo seleccionado del grupo que consiste de proteína A, proteína G, una lipocalina, un dominio de fibronectina, y un dominio

de repetición consenso de anquirina, y tioredoxina.

En ciertas modalidades, los agentes o anticuerpos de ligación a VEGF/DLL4 se pueden usar en cualquiera de una variedad de formas conjugadas (es decir, un inmunoconjugado o radioconjugado) o no conjugadas. En ciertas modalidades, los anticuerpos se pueden usar en una forma no conjugada para aprovechar los mecanismos de defensa naturales del sujeto incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento y toxicidad celular dependiente de anticuerpo para eliminar células malignas o cancerosas.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo o polipéptido) se conjuga a un agente citotóxico. En algunas modalidades, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico que incluye, pero no se limita a, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercaladores. En algunas modalidades, el agente citotóxico es una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, cadena de difteria A, fragmentos activos no de ligación de toxina de difteria, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Pitolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica

charantia, curcina, crotina, inhibidor de Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos. En algunas modalidades, el agente citotóxico es un radioisótopo para producir radioconjugado o anticuerpo radio conjugado. Una variedad de radionúclidos son disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados incluyendo, pero no limitado a, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re y ^{212}Bi. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como caliqueamicinas, maitansinoides, tricotecenos, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se pueden usar. Los conjugados de un anticuerpo y agentes citotóxicos se pueden hacer usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales, incluyendo, pero no limitado a, propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiiditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl adipimidato de dimetilo), esteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutareldehído), compuestos bis-azido (tal como hexanodiamina de bis(p-azidobenzoilo)), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

III. Polinucleótidos

En ciertas modalidades, la invención abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido (o un fragmento de un polipéptido) que liga específicamente a VEGF, DLL4, tanto VEGF como DLL4. El término “polinucleótidos que codifican un polipéptido” abarca un polinucleótido que incluye solamente secuencia de codificación para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias de codificación y/o no de codificación adicionales. Por ejemplo, en algunas modalidades, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo al VEGF humano codifica un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que comprende el sitio de ligación a antígeno). En algunas modalidades, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo DLL4 humano o codifica un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que comprende el sitio de ligación a antígeno. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN. El ADN incluye cADN, ADN genómico, y ADN sintético; y puede ser de doble hebra o hebra individual, y si es de hebra individual puede ser la hebra de codificación o hebra no de codificación (anti-sentido)

En ciertas modalidades, el polinucleótido comprende un

polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En ciertas modalidades, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, y SEQ ID NO: 64. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78.

En ciertas modalidades, del polinucleótido comprende un

polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80% idéntica, por lo menos aproximadamente 85% idéntica, por lo menos aproximadamente 90% idéntica, por lo menos aproximadamente 95% idéntica, y en algunas modalidades, por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. En ciertas modalidades, el polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80% idéntica, por lo menos aproximadamente 85% idéntica, por lo menos aproximadamente 90% idéntica, por lo menos aproximadamente 95% idéntica, y en algunas modalidades, por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID

NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que se hibrida a SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. En ciertas modalidades, la hibridación está bajo condiciones de alta severidad.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos comprenden la secuencia de codificación para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedera (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido de la células). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una proteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedera para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proteína que es la proteína madura más los residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una pro-secuencia

es una proteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la pro-secuencia se escinde permanece una proteína activa madura.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos comprenden la secuencia de codificación para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexa-histidina suministrad por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedero bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de hemaglutinina de influenza cuando un hospedero mamífero (por ejemplo, células COS-7) se usa. En algunas modalidades, la secuencia marcadora es una etiqueta FLAG, un péptido de la secuencia DYKDDDDK (SEQ ID NO:45) que se puede usar en conjunción con otras etiquetas de afinidad.

La presente invención se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos, y/o derivados.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona polinucleótidos que comprende polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos por lo menos

aproximadamente 80% idéntica, por lo menos aproximadamente 85% idéntica, por lo menos aproximadamente 90% idéntica, por lo menos aproximadamente 95% idéntica, y en algunas modalidades, por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), o fragmento del mismo, descrito en la presente.

Como se usa en la presente, la frase un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95% “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia se propone para referirse a esa secuencia de nucleótidos de polinucleótidos que es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos de por lo menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido, o una variedad de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales y en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones 5' o 3' terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar

entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones de codificación, regiones no de codificación, o ambas. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido contiene alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones, o supresiones, pero no altera las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido comprende sustituciones silenciosas que da por resultado ningún cambio a la secuencia de aminoácidos del polipéptido (debido a la degeneración del código genético). Las variantes de polinucleótido se pueden producir por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un hospedero particular (es decir, cambiar los codones en el mARN humano a aquellos preferidos por un hospedero bacteriano tal como E. coli). En algunas modalidades, una variante de polinucleótido comprende por lo menos una mutación silenciosa en una región no de codificación o de codificación de la secuencia.

En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para modular o alterar la expresión (o niveles de expresión) del polipéptido codificado. En algunas

modalidades, una variante de polinucleótido se produce para incrementar la expresión del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para disminuir la expresión de polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido tiene expresión incrementada del polipéptido codificado como es comparado con una secuencia de polinucleótido parenteral. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido tiene expresión disminuida del polipéptido codificado como es comparado con una secuencia de polinucleótido parenteral.

En algunas modalidades, por lo menos una variante de polinucleótido se produce (sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado) para incrementar la producción de una molécula heteromultimérica. En algunas modalidades, por lo menos una variante de polinucleótido se produce (sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado) para incrementar la producción de un anticuerpo biespecífico.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos se aíslan. En ciertas modalidades, los polinucleótidos son sustancialmente puros.

Los vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en la presente también se proporcionan. En algunas modalidades, un vector de expresión

comprende una molécula de polinucleótidos. En algunas modalidades, una célula hospedera comprende un vector de expresión que comprende la molécula de polinucleótido. En algunas modalidades, una célula hospedera comprende una molécula de polinucleótido.

IV. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

Los agentes de ligación (incluyendo polipéptidos y anticuerpos) de la invención que se ligan (por ejemplo, se ligan específicamente) a VEGF y/o DLL4 son útiles en una variedad de aplicaciones incluyendo, pero no limitado a, métodos de tratamiento terapéuticos, tales como el tratamiento de cáncer. En ciertas modalidades, los agentes son útiles para inhibir la actividad de VEGF, inhibir la señalización Notch inducida por DLL4, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el volumen de tumor, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un tumor, modular la angiogénesis, y/o inhibir la angiogénesis. Los métodos de uso pueden ser *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de VEGF humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de DLL4 humano. En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un antagonista de tanto VEGF como DLL4.

En ciertas modalidades, los agentes de ligación a

VEGF/DLL4 se usan en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, es decir angiogénesis incrementada y/o angiogénesis aberrante. En ciertas modalidades, la enfermedad es una enfermedad dependiente de la angiogénesis. En ciertas modalidades, los agentes de ligación a VEGF/DLL4 se usan en el tratamiento de trastornos caracterizados por niveles incrementados de células madre y/o células progenitoras.

La presente invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor usando los agentes de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpos descritos en la presente. En ciertas modalidades, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende poner en contacto una célula tumoral con un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, una línea de células inmortalizadas o una línea de células cancerosas se cultivan en el medio al cual se agrega un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-DLL4, o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas modalidades, las células tumorales se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión plural, o muestra de sangre y se cultiva en el medio al cual se agrega un agente de ligación a VEGF/DLL4 par a inhibir el crecimiento de células tumorales.

En algunas modalidades, el método para inhibir el

crecimiento de un tumor comprende poner en contacto un tumor o células tumorales con un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) *in vivo*. En ciertas modalidades, poner en contacto un tumor o célula tumoral con un agente de ligación a VEGF/DLL4 se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-DLL4, o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 se puede administrar a un animal hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que tienen un xenoinjerto de tumor. En algunas modalidades, las células tumorales y/o células madre cancerosas se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra de sangre y se inyecta en un animal hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que luego se les administra un agente de ligación a VEGF/DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de las células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento tumoral ("modelo preventivo"). En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se administra como un producto terapéutico después de que el tumor se ha desarrollado a un tamaño especificado ("modelo terapéutico"). En ciertas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente al

VEGF humano y DLL4 humano.

En ciertas modalidades, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4. En ciertas modalidades, el sujeto es un humano. En ciertas modalidades, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor que se removió. En ciertas modalidades, el tumor comprende células madre cancerosas. En ciertas modalidades, la frecuencia de células madre cancerosas en el tumor se reduce por la administración del agente de ligación a VEGF/DLL4. La invención también proporciona un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende poner en contacto el tumo con una cantidad efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4). En algunas modalidades, un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en un sujeto, comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4.

En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste de tumor colorectal, tumor de colon, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de la

vejiga, glioblastoma, y tumor de cabeza y cuello. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor colorectal o un tumor de colon. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor de ovario. En algunas modalidades, el tumor es un tumor de pulmón. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor pancreático. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor de mama.

La presente invención proporciona además métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4 a un sujeto. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a VEGF, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a DLL4, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga a VEGF y DLL4, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a VEGF, interfiere con las interacciones del receptor VEGF/VEGF, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a DLL4, interfiere con las interacciones DLL4/Notch, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a tanto VEGF como DLL4, interfiere con las interacciones

del receptor VEGF/VEGF y con las interacciones DLL4/Notch, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se liga a DLL4, y reduce la frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer.

La presente invención proporciona métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a agente de ligación a VEGF/DLL4 a un sujeto (por ejemplo, un sujeto en necesidad de tratamiento). En ciertas modalidades, el sujeto es un humano. En ciertas modalidades, el sujeto tiene un tumor canceroso. En ciertas modalidades, el sujeto ha tenido un tumor removido.

El cáncer/tumor del sujeto, puede, en algunas modalidades, ser refractario a ciertos tratamiento(s). Como un ejemplo no limitante, el cáncer del sujeto (o tumor) puede ser quimiorefractario. En ciertas modalidades, el cáncer del sujeto puede ser resistente a la terapia anti-VEGF o terapia anti-DLL4, o ambas.

En ciertas modalidades, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, glioblastoma, y cáncer de cabeza y

cuello. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de ovario. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer colorectal o cáncer de colon. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer pancreático. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de mama. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hematológico tal como leucemia o linfoma. En algunas modalidades, la leucemia o linfoma es una leucemia de células B o linfoma. En algunas modalidades, la leucemia o linfoma es una leucemia o linfoma de células T. En algunas modalidades, el cáncer hematológico es leucemia mielogenosa aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, leucemia de células capilares, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células T cutáneo, o leucemia linfoblástica aguda de células T.

La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en donde la enfermedad o trastorno se asocia con la angiogénesis. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno se asocia con angiogénesis aberrante. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno se asocia con angiogénesis incrementada. De esta manera, la presente invención proporciona métodos para modular la angiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva

de cualquiera de los agentes de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga al VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se liga a DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga al VEGF humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga al DLL4 humano. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga al VEGF humano y DLL4 humano.

Se proporcionan adicionalmente métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en donde la enfermedad o trastorno se caracteriza por un nivel incrementado de células madre y/o células progenitoras. En algunas modalidades, os métodos de tratamiento comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ligación a VEGF/DLL4, polipéptido, o anticuerpo al sujeto.

En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un

segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente al DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2

de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y un segundo sitio de ligación a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada

que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64, y una primera región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo

menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región

variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo anti-VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R79. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R75. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico

que comprende un sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de litación a antígeno del anticuerpo 21M18. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 219R45 y un segundo sitio de ligación a antígeno del anticuerpo 21R83. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

La presente invención proporciona además las composiciones farmacéuticas que comprende los agentes de ligación descrito en la presente. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento tumoral y/o para tratar el cáncer en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano).

En ciertas modalidades, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprende anticuerpos biespecíficos, en donde por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% de los anticuerpos en la composición son anticuerpos biespecíficos o anticuerpos heterodiméricos. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos IgG (por ejemplo, IgG2 o IgG1). En ciertas modalidades, menor que aproximadamente 10%, menor que aproximadamente 5%, menor que aproximadamente 2% o menor que aproximadamente 1% de los anticuerpos totales en las composiciones son anticuerpos monoespecíficos o anticuerpos homodiméricos. En ciertas modalidades, los anticuerpos en la composición por lo menos aproximadamente 98% heterodiméricos.

En ciertas modalidades, las formulaciones se preparan para almacenamiento y uso al combinar un anticuerpo o agente purificado de la presente invención con un vehículo

farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un portador o excipiente). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, soluciones amortiguadoras no tóxicas tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservadores tales como cloruro de amono de octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, fenol, butilo o alcohol bencílico, alquil-parabenos, tales como metil o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol; polipéptidos de peso molecular bajo (por ejemplo, menor que aproximadamente 10 residuos de aminoácido); proteínas tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; los aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tales como, sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal tal como complejos de proteína Zn; y surfactantes no iónicos tal como TWEEN o polietilenglicol (PEG). (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición*, 2005, University of the Sciences, Filadelfia, PA).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en cualquier variedad de formas para cualquier tratamiento local sistémico. La administración puede ser tópica por parches epidérmicos o transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, rocíos, líquidos, y polvos; pulmonar por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador, intra-traqueal, e intranasal; oral; o parenteral incluyendo intravenosa, intraarterial, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular (por ejemplo, inyección o infusión), o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en una forma de dosificación unitaria. Tales formulaciones incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios. En las composiciones sólidas tales como tabletas el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los ingredientes para la formación de tabletas convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y diluyentes (por ejemplo, agua). Estos se pueden usar para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica de

la misma. La composición de pre-formulación sólida luego se subdivide en formas de dosificación unitarias de un tipo descrito en lo anterior. Las tabletas, píldoras, etc., de la formulación o composición se pueden recubrir o de otra manera componer para proporcionar una forma de dosificación que permite la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente exterior. Adicionalmente, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o que se retarde en la liberación. Una variedad de materiales se puede usar para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen una variedad de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes o anticuerpos de ligación a VEGF/DLL4 o descritos en la presente también se pueden atrapar en microcápsulas. Tales microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de co-acervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y

nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *21ª Edición*, 2005, University of the Sciences en Filadelfia, PA.

En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas incluyen un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención formado en complejo con liposomas. Los métodos para producir liposomas son bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Por ejemplo, algunos liposomas se pueden generar por evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se pueden extruír a través de filtros de tamaño de poro definidos para producir liposomas con el diámetro deseado.

En ciertas modalidades, las preparaciones de liberación sostenidas se pueden producir. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), donde las matrices están en la forma de artículos formados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Ejemplos adicionales de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, tales como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilacturos, copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-

glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como LUPRON DEPOT^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), isobutirato de acetato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

En ciertas modalidades, además de administrar un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), el método o tratamiento comprende además administrar por lo menos un agente terapéutico adicional. Un agente terapéutico adicional se puede administrar antes de, concurrentemente con, y/o subsecuentemente a, la administración del agente de ligación a VEGF/DLL4. Las composiciones farmacéuticas que comprende un agente de ligación a VEGF/DLL4 y el agente(s) terapéutico adicional también se pueden proporcionar. En algunas modalidades, el por lo menos un agente terapéutico adicional comprende 1, 2, 3, o más agentes terapéuticos adicionales.

La terapia de combinación con por lo menos dos agentes terapéuticos usa frecuentemente agentes que trabajan por mecanismos de acción diferentes, aunque no se requiere. La terapia de combinación que usa agentes con diferentes mecanismos de acción puede dar por resultado efectos de aditivo o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que se use en la

monoterapia, reduciendo de esta manera los efectos secundarios tóxicos y/o incrementando el índice terapéutico de por lo menos uno de los agentes. La terapia de combinación puede disminuir la probabilidad de que las células cancerosas resistentes se desarrollen. En algunas modalidades, la terapia de combinación comprende un agente terapéutico que afecta principalmente (por ejemplo, inhibe o extermina) células no tumorigénicas y un agente terapéutico que afecta principalmente (por ejemplo, inhibe o extermina) CSCs tumorigénicos.

Las clases útiles de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina, auristatinas, aglutinantes de la hendidura menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes de alquilación (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatina, mono(platino), bis(platino) complejos de platina tri-nucleares y carboplatina), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sintetizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etoposidos, pirimidinas fluoradas, ionoforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, antimetabolitos de purina, puromicinas, sintetizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca, o similares. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente de alquilación, un anti-metabolito, un antimitótico, un inhibidor de topoisomerasa o un inhibidor de angiogénesis.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un complejo de platino tal como carboplatina o cisplatina. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un complejo de platino en combinación con un taxano.

Los agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con los agentes de ligación a VEGF/DLL4 incluyen agentes quimioterapéuticos. De esta manera, en algunas modalidades, el método o tratamiento implica la administración de un agente o anticuerpo de ligación a anti-VEGF de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. En algunas modalidades, el método o tratamiento implica la administración de un agente o anticuerpo de ligación a anti-DLL4 de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. En algunas modalidades, el método o tratamiento implica la administración de un anticuerpo biespecífico de la presente invención que se liga a VEGF y DLL4, en combinación con un agente quimioterapéutico o coctel de múltiples agente quimioterapéuticos diferentes.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes de alquilación tal como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo tal como busulfan, improsulfan y

piposulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosfaoramida y trimetilolomelamima; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, cloARNfazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicin, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-

azauridina, carmofor, arabinosida de citosina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostana, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedores de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK; razoxana; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido (Ara-C); taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL) y docetaxel (TAXOTERE); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico;

esperamicinas; capecitabina (XELODA); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazolos inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es cisplatina. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es carboplatina. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es paclitaxel.

En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos que interfieren con la acción de una enzima de topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina HCl, citrato de daunorubicina, mitoxantrona HCl, actinomicina D, etopósido, topotecano HCl, tenipósido (VM-26), e irinotecano, así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de

cualquiera de estos. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es irinotecano.

En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un anti-metabolito. Un anti-metabolito es un químico con una estructura que es similar a un metabolito requerido para las reacciones bioquímicas normales, todavía suficientemente diferente para interferir con una o más de las funciones normales de las células, tal como la división celular. Los anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato sódico, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinosido, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina, y cladribina, así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de cualquiera de estos. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es gemcitabina.

En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un agente antimitótico, incluyendo, pero no limitado a, agentes que se ligan a la tubulina. En algunas modalidades, el agente es un taxano. En ciertas modalidades, el agente es paclitaxel o docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable, ácido, o derivado de paclitaxel o docetaxel. En ciertas modalidades, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel ligado a albúmina (ABRAXANE), DHA-paclitaxel, o PG-paclitaxel. En ciertas

modalidades alternativas, el agente antimitótico comprende un alcaloide de la vinca, tal como vincristina, vinblastina, vinorelbina, o vindesina, o sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de los mismos. En algunas modalidades, el agente antimitótico es un inhibidor de quinesina Eg5 o un inhibidor de una cinasa mitótica tal como Aurora A o Plk1. En ciertas modalidades, donde el agente quimioterapéutico administrado en combinación con un agente de ligación a VEGF/DLL4 es un agente antimitótico, el cáncer o tumor que se trata es cáncer de mama o un tumor de mama.

En algunas modalidades, un segundo agente terapéutico comprende un agente tal como una molécula pequeña. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo un anticuerpo) de la presente invención con una molécula pequeña que actúa como un inhibidor contra las proteínas asociadas a tumor adicionales incluyendo, pero no limitado a, EGFR, ErbB2, HER2, y/o VEGF. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de la trayectoria Notch. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de la molécula pequeña de la ruta Wnt. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de la

ruta BMP. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña que inhibe la señalización de β-catenina.

En algunas modalidades, un segundo agente terapéutico comprende una molécula biológica, tal como un anticuerpo. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de n agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo un anticuerpo) de la presente invención con otros anticuerpos contra proteínas asociadas a tumor adicionales que incluyen, pero no limitado a, anticuerpos que se ligan a EGFR, ErbB2, HER2, y/o VEGF. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un anticuerpo marcador de células madre anti-cancerosas. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se liga a un componente de la trayectoria Notch. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se liga a un componente de la ruta Wnt. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la trayectoria Notch. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la ruta Wnt. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la ruta BMP. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo

que inhibe la señalización de β-catenina. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un inhibidor o modulador de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo receptor anti-VEGF o VEGF). En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX), o cetuximab (ERBITUX). La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una formulación farmacéuticamente individual o usando formulaciones separadas, o a la administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.

Adicionalmente, el tratamiento con un agente de ligación a VEGF/DLL4 descrito en la presente puede incluir tratamiento de combinación con otras moléculas biológicas, tal como una o más citocinas (por ejemplo, linfocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral, y/o factores de crecimiento) o se pueden acompañar por la remoción quirúrgica de tumores, células cancerosas, o cualquier otra terapia evaluada necesaria por un médico tratante.

En ciertas modalidades, el tratamiento implica la administración de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo un anticuerpo) de la presente invención en combinación con terapia de radiación. El tratamiento con un

agente de ligación a VEGF/DLL4 puede presentarse antes, concurrentemente con, o subsecuente a la administración de la terapia de radiación. Los programas de dosificación para tal terapia de radiación se pueden determinar por el profesional médico experto.

Se apreciará que la combinación de un agente de ligación a VEGF/DLL4 y un agente terapéutico adicional se puede administra en cualquier orden o concurrentemente. El tratamiento con un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se puede presentar antes, concurrentemente con, o subsecuente a la administración de las quimioterapias. La administración combinada puede incluir co-administración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o usando formulaciones separadas, co-administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine empíricamente por el profesional experto. Los programas de preparación y dosificación para tal quimioterapia también se describen en *The Chemotherapy Source Book, 4ª Edición*, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.

En algunas modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará a pacientes que se han sometido previamente al tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras modalidades, el agente de ligación a VEGF/DLL4 y un segundo agente terapéutico se administrarán sustancialmente de manera simultánea o concurrentemente. Por ejemplo, un sujeto se le puede administrar un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) mientras que se somete a un curso de tratamiento con un segundo agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia). En ciertas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 1 año del tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades alternativas, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 10, 8, 6, 4, o 2 meses de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 4, 3, 2, o 1 semanas de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 5, 4, 3, 2, o 1 días de cualquiera tratamiento con un segundo agente terapéutico. Se apreciará adicionalmente que los dos (o más) agentes o tratamientos se pueden administrar al sujeto dentro de una cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente de manera simultánea).

Para el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención depende del tipo de enfermedad que se trata, la gravedad y curso de la enfermedad, la sensibilidad de la enfermedad, si el agente de ligación a VEGF/DLL4 o anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, el historial clínico del paciente, y así sucesivamente, todo en la discreción del médico que trata. El agente o anticuerpo de ligación a VEGF/DLL4 se puede administrar una vez o como una serie de tratamientos separados durante varios días a varios meses, o hasta que se lleve a cabo una cura o se logre una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y vararán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o agente individual. El médico que administra puede determinar las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación, y velocidades de repetición. En ciertas modalidades, la dosificación de un agente o anticuerpo de ligación a VEGF/DLL4 es de aproximadamente 0.01µg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0.1µg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1µg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1mg a

aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1mg a aproximadamente 80mg/kg de peso corporal de aproximadamente 10mg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10mg a aproximadamente 75mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 10mg a aproximadamente 50mg/kg de peso corporal. En ciertas modalidades, la dosificación del anticuerpo u otro agente de ligación a VEGF/DLL4 es de aproximadamente 0.1mg a aproximadamente 20mg/kg de peso corporal. En ciertas modalidades, la dosificación se puede administrar una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente, o al año. En ciertas modalidades, el anticuerpo u otro agente de ligación a VEGF/DLL4 se administra una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada mes.

En algunas modalidades, un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se puede administrar en una dosis de “carga” más alta inicial, seguido por una o más dosis más bajas. En algunas modalidades, la frecuencia de administración también puede cambiar. En algunas modalidades, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis inicial, seguido por dosis adicionales (o dosis “de mantenimiento”) una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez cada mes. Por ejemplo, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguido por una dosis

de mantenimiento semana de, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguido por dosis de mantenimiento de, por ejemplo la mitad de la dosis inicial cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender administrar tres dosis iniciales durante 3 semanas, seguido por dosis de mantenimiento de, por ejemplo, la misma cantidad cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis inicial seguido por dosis adicionales cada 3 semanas o una vez al mes. El médico que trata puede estimar las velocidades de repetición para la dosificación basado en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. El progreso de la terapia se puede supervisar por técnicas y ensayos convencionales.

Como es conocido por aquellas personas de experiencia en el campo, la administración de cualquier agente terapéutico puede conducir a efectos secundarios y/o toxicidades. En algunos casos, los efectos secundarios y/o toxicidades son tan graves como para impedir la administración del agente particular en una dosis terapéuticamente efectiva. En algunos casos, la terapia de fármacos se debe descontinuar, y se pueden probar otros agentes. Sin embargo, muchos agentes en la misma clase terapéutica muestran frecuentemente efectos secundarios y/o toxicidades similares, lo que significa que

el paciente tiene que detener ya sea la terapia, o si es posible, sufrir de los efectos secundarios desagradables asociados con el agente terapéutico.

Los efectos secundarios de los agentes terapéuticos pueden incluir, pero no se limitan a, urticaria, sarpullido, comezón, nausea, vomito, apetito disminuido, diarrea, escalofríos, fiebre, fatiga, molestias musculares y dolor, dolores de cabeza, presión arterial baja, presión arterial alta, hipocalemia, recuentos sanguíneos bajos, sangrado, y problemas cardiacos.

De esta manera, un aspecto de la presente invención se dirige a métodos para tratar cáncer en un paciente que comprende administrar un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente, que puede reducir los efectos secundarios y/o toxicidad asociadas con la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. Como se usa en la presente, “dosificación intermitente” se refiere a un régimen de dosificación que usa un intervalo de dosificación de más de una vez a la semana, por ejemplo, dosificación de una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, etc. En algunas modalidades, un método para tratar cáncer en un paciente humano comprende administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de acuerdo con un régimen de dosificación

intermitente. En algunas modalidades, un método para tratar cáncer en un paciente humano comprende administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente, e incrementar el índice terapéutico del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 a aproximadamente una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes de anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 a aproximadamente una vez cada 3 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 aproximadamente una vez cada 4 semanas.

En algunas modalidades, la dosis subsecuente en un régimen de dosificación intermitente son aproximadamente la misma cantidad o menor que la dosis inicial. En otras modalidades, la dosis subsecuente es una cantidad mayor que

la dosis inicial. Como es sabido por aquellas personas de experiencia en el campo, las dosis usadas variaran dependiendo de los objetivos clínicos que se logren. En algunas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 0.25mg/kg a aproximadamente 20mg/kg. En algunas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 0.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 1mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 2.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 7.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 10mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 12.5mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 15mg/kg. En ciertas modalidades, la dosis inicial es de aproximadamente 20mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0.25mg/kg a aproximadamente 15mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0.5mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son

de aproximadamente 1mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 2.5mg/kg. En ciertas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 5mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 7.5mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 10mg/kg. En algunas modalidades, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 12.5mg/kg.

En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2.5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2.5 mg/kg una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2.5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2.5 mg/kg una vez cada 3 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de

un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 3 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2.5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2.5 mg/kg una vez cada 4 semanas. En algunas modalidades, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 4 semanas. En ciertas modalidades, la dosis inicial y la dosis de mantenimiento son diferentes, por ejemplo, la dosis inicial es de aproximadamente 5mg/kg y la dosis subsecuente son de aproximadamente 2.5mg/kg. En ciertas modalidades, un régimen de dosificación intermitente puede comprender una dosis de carga, la dosis inicial es de aproximadamente 20mg/kg y las dosis subsecuentes son de aproximadamente 2.5mg/kg o aproximadamente 5mg/kg administradas una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez cada 4 semanas.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para reducir la toxicidad de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en un paciente humano que

comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente. Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para reducir los efectos secundarios de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en un paciente humano que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente. Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para incrementar el índice terapéutico de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de un paciente humano que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente.

La elección del método de administración para la dosis iniciales y subsecuentes se hace de acuerdo con la capacidad del paciente animal o humano de tolerar la introducción del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en el cuerpo. De esta manera, en cualquiera de los aspectos y/o modalidades descritas en la presente, la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 puede ser mediante inyección intravenosa o intravenosamente. En algunas modalidades, la administración es por infusión intravenosa. En cualquiera de los aspectos y/o modalidades descritas en la presente, la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 puede ser por una vía no intravenosa.

V. Kits que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4

La presente invención proporciona kits que comprenden los agentes de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpos) descritos en la presente y que se pueden usar para llevar a cabo los métodos descritos en la presente. En ciertas modalidades, un kit comprende por lo menos un anticuerpo purificado contra VEGF y/o DLL4 en uno o más contenedores. En algunas modalidades, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para llevar a cabo un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, indicaciones para llevar a cabo los ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de los resultados. Una persona experta en el campo reconocerá fácilmente que los agentes de ligación a VEGF/DLL4 dados a conocer de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en el campo.

Se proporcionan además kits que comprenden un agente de ligación a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4), así como por lo menos un agente terapéutico adicional. En ciertas modalidades, el segundo (o más) agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. En ciertas modalidades, el segundo (o más) agente terapéutico es un inhibidor de angiogénesis.

Modalidades de la presente descripción se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se describen en preparación detallad en ciertas modalidades de la presente descripción y métodos para usar los anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para aquellas personas expertas en el campo que muchas modificaciones, tanto materiales como métodos, se pueden practicar sin apartarse del alcance de la presente descripción.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Afinidades de ligación de los anticuerpos anti-VEGF/anti-DLL4

Las K_Ds de los anticuerpos parenterales anti-VEGF 219R45 (formato IgG), anti-DLL4 21R79 (formato IgG), anti-DLL4 21M18 (formato IgG) y anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se determinaron usando un sistema Biacore 2000 de Biacore LifeSciences (GE Healthcare). Proteínas de DLL4-Fc humanas o DLL4-Fc de ratón recombinantes se inmovilizaron sobre chips de carboxilo CM5 usando química basada en amina estándar (NHS/EDC) y se bloquearon con etanolamina. La $VEGF_{165}$ humana o $VEGF_{165}$ de ratón recombinantes se biotinilaron y se inmovilizaron sobre chips de estreptavidina. Los anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de 100nM a 0.78nM en HBS-P (HEPES 0.01M pH7.4, NaCl 0.15M, 0.005% v/v de Polisorbato 20). Para cada anticuerpo, las 8

diluciones se inyectaron secuencialmente sobre un chip específico. Los datos cinéticos se recolectaron a través del tiempo y se ajustaron usando ecuación de ajuste global simultáneo para producir constantes de afinidad (valores K_D) para cada anticuerpo biespecífico.

Tabla 3

Anticuerpo	hVEGF (nM)	mVEGF(nM)	hDLL4 (nM)	mDLL4 (nM)
219R45	0.67	22.9	NB	NB
21M18	NB	NB	<0.1	NB
21R79	NB	NB	<0.1	NB
219R45-MB-21M18	0.36	25.5	16	NB
219R45-MB-21R79	0.68	12.5	0.53	NB

Como se muestra en la Tabla 3, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tuvo una constante de afinidad (K_D) para el VEGF humano de 0.36nM y una K_D para el DLL4 humano de 16nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tuvo una K_D para el VEGF humano de 0.68nM y una K_D para el DLL4 humano de 0.53nM. Ambos anticuerpos biespecíficos mostraron ligación más débil al VEGF de ratón como es comparado con el VEGF humano y ningún anticuerpo se ligó al DLL4 de ratón. De esta manera, ambos anticuerpos biespecíficos mostraron afinidad de ligación similar al VEGF

humano y 219R45-MB-21R79 mostró aproximadamente una ligación 30 veces más potente al DLL4 humano que el 219R45-MB-21M18. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tuvo una afinidad de ligación similar a VEGF humano a pesar del hecho de que el anticuerpo biespecífico es monovalente para VEGF como es comparado con el anticuerpo parenteral bivalente.

Se identificaron varios anticuerpos anti-DLL4 adicionales que tuvieron afinidades de ligación intermedias con las K_Ds de 21M18 y 21R79. Dos de estos anticuerpos anti-DLL4 se usaron para producir anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R75 y 219R45-MB-21R83. Usando el sistema Biacore 2000 como se describe en lo anterior, las K_Ds de los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21R75 y 219R45-MB-21R83 al de DLL4 humano se determinaron. Una comparación de la afinidad de ligación al DLL4 humano de estos cuatro anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se muestra en la Tabla 4.

Las CDRs para los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se muestran en la Figura 1A. La región variable de cadena pesada y cadena ligerea SEQ ID NOs se muestran en la Figura 1B y la SEQ ID Nos de cadena pesada y cadena ligera (con o sin secuencia señal) como se muestra en la Figura 1C.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 comprende una (a) cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:75 depositado con American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, EUA, bajo las condiciones del Tratado de Budapest del 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositado con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest del 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositado con el ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre de 2012, y se le asignó el número de designación PTA__.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:31 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__, y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21

de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__.

En anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 y 219R45-MB-21R83 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:72 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el__ y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA__, e (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación en PTA__.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R75 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:74 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__ y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21

de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA__.

Tabla 4

Anticuerpo	CDR2 de cadena pesada	hDLL4 (nM)
219R45-MB-21M18	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	16.00
219R45-MB-21R79	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	0.53
219R45-MB-21R75	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	5.10
219R45-MB-21R83	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	1.30

Ejemplo 2

Ensayo HTRF para la ligación simultánea de anticuerpos biespecíficos a VEGF humano y DLL4 humano.

Para caracterizar las capacidades de ligación de ciertos anticuerpos y/o mezcla de anticuerpos a tanto VEGF como DLL4, se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia resueltos en el tiempo homogéneo (HTRF). Los anticuerpos sometidos a prueba fueron los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, los anticuerpos parenterales 219R45 (anti-VEGF), 21M18 (anti-DLL4), 21R79 (anti-DLL4), una combinación de 219R45 y 21M18, una combinación de 219R45 y 21R79. Los anticuerpos o mezclas de anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de

3000nM a 2.9nM en solución amortiguadora de ligación (1X de PBS, 0.1% de gelatina, 0.1% Polisorbato 20, fluoruro de potasio 400mM) y se colocaron en una placa de 96 pocillos blancos. Un volumen igual de solución que contiene 4µg/ml de hDLL4-Fc etiquetado con d2 y 21.4ng/ml de $hVEGF_{165}$ etiquetado con tripato de Europio se agregaron a cada pocillo para un volumen final de 100µl (concentraciones finales de fluoróforo aceptores y donadores fueron de 2µg/ml y 10.7ng/ml, respectivamente). Las placas de ensayo se incubaron durante 2 horas durante la noche y se leyeron sobre un lector de Micro placas SpectraMax M5e (Molecular Devices, Sunnyvale CA) en una longitud de onda de excitación de 314nm.

Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, fueron capaz de ligarse tanto a hVEGF como a hDLL4 simultáneamente. De manera importante, ninguna de las combinaciones de los anticuerpos parenterales (es decir, 219R45 y 21M18 o 219R45 y 21R79) fueron capaces de ligarse a VEGF y DLL4 simultáneamente. Estos resultados muestran claramente que los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 son capaces de funcionar de manera diferente que una simple mezcla de los dos anticuerpos individuales.

Ejemplo 3

Inhibición de la proliferación de HUVEC por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4

Células HUVEC se obtuvieron de Lonza (Walkersville MD) y se cultivaron en un medio de crecimiento (M199, 10% de FBS inactivado por calor (HI-FBS), 50µg/ml de EGS, 1X de heparina, L-glutamina 1mM). Para de proliferación de HUVEC, una placa de 96 pocillos se pre-recubrió con 50µl de 10µg/ml de solución tipo I de colágeno de cola de rata (colágeno I en ácido acético 0.02N) y se incubó a 4°C durante la noche. Después de la incubación, la palca se aspiró completamente para remover la solución de colágeno I no ligada y se lavó una vez con 200µl de DPBS. Las células HUVEC se removieron de la superficie de los matraces de crecimiento usando un reactivo sub-clon de células endoteliales y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se volvieron a suspender en un medio de inanición/ensayo (M199 y 2% de HI-FBS, 1X de heparina, 5U/ml heparina-glutamina) en una densidad de 10^5 células/ml. Las células se sembraron en una placa de ensayo recubierta con colágeno a 5000 células/pocillo, 50ul/pocillo. Las células se incubaron durante 3 horas a 37°C, se lavaron una vez, se volvieron a alimentar con 100ul de medio de ensayo, y se incubaron durante la noche a 37°C. Al siguiente día, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, en anticuerpo parenteral 219R45, o el anticuerpo de control LZ1 se

prepararon en una mezcla con VEGF humano (R&D Biosystems, Minneapolis MN). Los anticuerpos se diluyeron en serie 5 veces de 20µM a 0.25nM en solución amortiguadora de ensayo en combinación con hVEGF (concentración final 5ng/ml). La mezcla se pre-incubó a 37°C durante 2 horas. El medio se removió de la placa de ensayo, y 100µl de la mezcla de anticuerpo/hVEGF se agregó a cada pocillo. Después de 3-4 días de incubación, el medio se removió y una alícuota reciente de la mezcla de anticuerpo/hVEGF se agregó a cada pocillo y se dejó incubar durante otros 4 días. En el día 7, 20µl de reactivo Azul Alamar (Invitrogen, Carlsbad, CA) se agregó a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 5-6 horas. La placa se leyó con un lector de Micro placas SpectraMax M5e (Molecular Devices, Sunnyvale CA) usando una longitud de onda de excitación de 539nm y una longitud de onda de emisión de 590nm.

Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, así como el anticuerpo anti-VEGF parenteral 219R45 mostraron proliferación de HUVEC. Estos resultados muestran que los anticuerpos biespecíficos fueron capaces de inhibir la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC.

Ejemplo 4

Inhibición de la señalización Notch inducida por DLL4 por anticuerpos específicos.

Células PC3 humanas se transfectaron con un vector de

expresión que codifica un receptor Notch2 humano de longitud completa y un vector reportero de luciferasa de luciérnaga (reportero 8xCBF-luciferasa) que es responsable de la señalización Notch. Las células también se transfectaron con un reportero de luciferasa Renilla (Promega, Madison WI) como un control interno para la eficiencia de la transfección. La proteína DLL4 humana purificada se recubrió sobre placas de 96 pocillos a 100ng/pocillo y las células PC3-luc que expresan Notch2 se agregaron a los pocillos. Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, anticuerpos anti-DLL4 parenterales 21M18, 21R79 o un anticuerpo de control LZ1 se diluyeron en serie 5 veces de 20ug/ml a 0.064ug/ml, se agregaron a los pocillos apropiados, y se incubaron durante la noche. La actividad de la luciferasa se determinó usando un kit de ensayo de luciferasa doble (Promega, Madison, WI) con actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada con la actividad de luciferasa Renilla.

Como se muestra en la Figura 4, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 y los anticuerpos anti-DLL4 parenterales 21M18 y 21R79 inhibieron la señalización Notch inducida por DLL4. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 inhibió la señalización Notch inducida por DLL4 solamente en consideraciones de anticuerpo altas. Estos resultados mostraron que el anticuerpo

biespecífico anticuerpo 219R45-MB-21R79, y a un grado menor del anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18, fueron capaces de inhibir la señalización Notch inducida por DLL4. De esta manera, en combinación con los resultados presentados en el Ejemplo 3, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 y 219R45-MB-21M18, habían mostrado la capacidad de inhibir las funciones de señalización y/o proliferación inducidas tanto por VEGF como de DLL4.

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por un anticuerpo biespecífico en un modelo de injerto de piel humana.

Un modelo de injerto de piel humana se ha reportado que comprende un injerto de piel humana y células tumorales humanas. Se establece un injerto de piel humana y luego las células tumorales humanas se implantan en el injerto de piel, permitiendo que las células tumorales se desarrollen en un entorno con estroma y vasculatura humana (Tahtis y colaboradores, 2003, Mol. Cancer Ther. 2:229-737). Las muestras de piel humana se obtuvieron de tejido de prepucio neonatal y se injertó en el flanco lateral de ratones NOD-SCID. Después del establecimiento del injerto de piel, células tumorales de colon OMP-C8 etiquetadas con luciferasa (20,000 células) se inyectaron intradérmicamente en la piel humana. El crecimiento tumoral se supervisó por formación de imágenes de bioluminiscencia usando un sistema de formación

de imágenes IVIS (Caliper Life Sciences, Mountain View, CA). Los tumores se dejaron desarrollar hasta que alcanzaron 1.2 x 10^6 fotones por segundo. Los ratones que llevan tumor (n = 6 ratones/grupo) se eligieron al azar y se trataron con Ab de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab, o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18. Los animales se trataron una vez a la semana y los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 25mg/kg. El crecimiento tumoral se supervisó por formación de imágenes de bioluminiscencia en los días indicados.

Como se muestra en la Figura 5, tanto el anticuerpo anti-hDLL4 21M18 como el anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab inhibieron el crecimiento tumoral en este modelo de injerto de piel humana/tumor humano. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 fue más efectivo que ya sea el anticuerpo anti-DLL4 o el anticuerpo anti-VEGF solo. Estos datos muestran la utilidad fijar como objetivo simultáneamente el DLL4 y VEGF con un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 6

Tumorigenicidad de células tumorales pancreáticas OMP-PN8 después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4.

Ratones que llevan tumores pancreáticos OMP-PN8 se

trataron con anticuerpo de control (15 mg/kg), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (15 mg/kg), anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab (15 mg/kg), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 (30 mg/kg) con o sin gemcitabina (70 mg/kg). Después de cuatro semanas de tratamiento, los tumores se recolectaron, se procesaron a suspensiones de células individuales y las células tumorales humanas se purificaron por agotamiento inmunomagnético de células de murino. 90 células tumorales humanas de cada grupo del tratamiento se transfirieron a un nuevo cohorte de ratones (n = 10 ratones/grupo). Los tumores se dejaron desarrollar durante 55 días sin ningún tratamiento y los volúmenes del tumor se midieron con calibradores electrónicos.

La Figura 6 muestra el volumen de tumor de los ratones individuales en cada grupo. Las células aisladas de ratones tratados con anticuerpo anti-hDLL4 21M18 tuvieron un tumorigenicidad disminuida en gran medida, 5 de 10 ratones tuvieron tumores, como es comparada con las células aisladas de ratones tratados con el anticuerpo de control donde 9 de 10 ratones tuvieron tumores. La reducción en la frecuencia del crecimiento tumoral indica una reducción en la frecuencia de células madre cancerosas. En contraste, el tratamiento con bevacizumab no dio por resultado reducción de la frecuencia del crecimiento tumoral, 10 de 10 ratones tuvieron tumores. Similar al bevacizumab, el tratamiento con gemcitabina como un solo

agente no tuvieron efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral ya que 10 de 10 ratones tuvieron tumores. Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 ambos redujeron la frecuencia del crecimiento tumoral (5 de 10 ratones tuvieron tumores y 4 de 10 ratones tuvieron tumores, respectivamente). El tratamiento de combinación con gemcitabina pareció que no tiene efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral. Estos datos indican que el DLL4 objetivo reduce la frecuencia de células madre cancerosas mientras que el VEGF objetivo solo no lo hace. De manera importante, estos datos indican que la actividad anti-CSC del anticuerpo anti-DLL4 se retiene en un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 7

ELISA de Anticuerpo Biespecífico

El VEGF (ATGEN, Corea del Sur) se recubrió sobre placas Nunc maxisorb a 2ug/ml (100µl/pocillo) y se incubó durante la noche a 2-8°C. Los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo (1x de PBS, 0.1% de gelatina 0.1% de Polisorbato-20, pH 7.4) que contiene 2µg/ml de biotina-DLL4-hFc. Los anticuerpos se diluyeron en serie 3 veces de 500ng/ml a 0.008ng/ml. Las muestras de anticuerpo se incubaron durante 2 horas en solución amortiguadora de bloqueo que contiene la biotina-DLL4-hFc. Después de la incubación, las muestras de anticuerpo se

transfirieron a la placa de ensayo recubierta con VEGF (100 ul/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se agregó a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. El substrato TMB se agregó a los pocillos con un desarrollo de color de 10 minutos y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se leyó a 450-650nm y los datos se analizaron usando el ajuste de 4 parámetros dentro del programa de análisis Softmax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

La Figura 7 muestra las curvas de titulación de los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 (círculos abiertos), 219R45-MB-21R79 (cuadrados abiertos), 219R45-MB-21R75 (triángulos abiertos), y 219R45-MB-21R83 (triángulos abiertos) en comparación con un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de referencia (círculos sólidos). Las potencias relativas para los anticuerpos biespecíficos como es comparado con el anticuerpo biespecífico de referencia se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Anticuerpo	Potencia Relativa (%)
219R45-MB-21M18	67
219R45-MB-21R79	501
219R45-MB-21R75	422
219R45-MB-21R83	222

El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 que el más potente, aproximadamente 7 veces más potente que 219R45-MB-21M18, que reflejó la afinidad más alta del sitio de ligación a antígeno 21R79.

Ejemplo 8

Producción de Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos se produjeron usando una línea de células GS-CHO. Las células CHOK1SV (Lonza Biologics) se transfectaron a través de electroporación con el gen(s) de interés acoplado con glutamina sintetasa (GS) como el marcador seleccionable. Los transfectantes y subclones se clasificaron para la productividad de anticuerpos y los productores altos se seleccionaron para la producción de mayor escala. Las células se desarrollaron usando un proceso de lote de alimentación y bioreactores de lote de alimentación. El anticuerpo acumulado en el fluido de cultivo de células recolectadas (HCCF) se aisló y se purificó usando técnicas de cromatografía.

Líneas de células de anticuerpo biespecíficos 219R45-MB-21M18.010.017 y 219R45-MB-21R79.017.003 se cultivaron en bioreactores de tanque agitados de 5L durante 14 días. Las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017 produjeron un título de anticuerpo final de 3.0g/L y la línea de células 219R45-MB-21R79.017.003 produjo un título de anticuerpo final de 0.8g/L. Las líneas de células 219R45-MB-21R75.101 y

219R45-MB-21R83.113 se cultivaron en sistemas de bioreactor WAVE de 25L (GE Healthcare) usando un proceso de lote de alimentación que logró títulos de anticuerpo finales de 0.4g/L. Las líneas de células de anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18AG.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014 y 219R45-MB-21R83AG.129.003 se cultivaron en bioreactores de tanque de agitado de 5 L durante 14 - 15 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.138.007 produjo un título de anticuerpo final de 1.0 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.038.009 produjo un título de anticuerpo final de 1.6 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.142.002 produjo un título de anticuerpo final de 2.6 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21R79AG.072.014 produjo un título de anticuerpo final de 2.1 g/L después de 15 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.038.009 produjo un título de anticuerpo final de 2.4 g/L después de 15 días. El fluido de cultivo se recolectó por filtración de cada una de estas cuatro líneas de células y se sometió a la cromatografía de afinidad de proteína A. La columna de proteína A se lavó con una serie de soluciones amortiguadoras y los anticuerpos se eluyeron usando una solución amortiguadora de elución con pH bajo. La caracterización inicial de la pureza de los anticuerpos biespecíficos se llevó a cabo usando cromatografía de

exclusión de tamaño (SEC-HPLC) y en foque isoeléctrico (IEF).

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se usó para determinar la pureza del producto de anticuerpo. La SEC es un método cromatográfico bien conocido en el cual las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) en solución se separan por su tamaño. La SEC se puede usar para distinguir un producto de anticuerpo de agregado y/o impurezas, y para determinar el porcentaje del producto de anticuerpo como es comparado con la mezcla total. Como se usa en la presente, la SEC no distingue entre un anticuerpo homomérico y un anticuerpo biespecífico heterodimérico.

El enfoque isoeléctrico capilar de imagen (icIEF) se usó para determinar la identidad y pureza de los heterodímeros de anticuerpo biespecífico. Usando el icIEF, las isoformas de carga del anticuerpo se separan de acuerdo con su pI y el resultado es una “huella” de la distribución de carga del anticuerpo. El método icIEF también puede servir como una determinación de pureza al separar los heterodímeros de anticuerpo biespecífico por su pI distinta de cualquiera de los productos o impurezas de homodímeros.

Las muestras de anticuerpo biespecíficos se analizaron por icIEF en un instrumento ProteinSimple ICE280 (ProteinSimple, Santa Clara, CA). Para este análisis, una mezcla de proteínas se introduce en un capilar, se aplica voltaje alto a través del capilar y los anfolitos establecen

un gradiente de pH lineal a lo largo de la longitud del capilar. Bajo la influencia del campo eléctrico, los marcadores de pI y la mezcla de protección ambos migran la longitud del capilar hasta que se alcanza un valor de pH donde la carga neta es cero. Una vez enfocado, el instrumento ICE280 usa una detección de formación de imágenes de columna completa con una cámara UV de 280-nm para supervisar el patrón de las isoformas de proteína dentro del capilar. El electroferograma resultante se calibra usando marcadores de pI internos y se integra para establecer el porcentaje de área respectivas de las isoformas cargadas diferentes de la mezcla de proteínas. Los perfiles de carga de varios anticuerpos específicos anti-VEGF/anti-DLL4 se muestran en la Figura 8. Para este experimento, se diluyeron eluatos de Proteína A con agua MilliQ a una concentración de 6.6mg/ml. Un total de 18µl de la muestra se mezclaron con 100µL de 8M urea, 70µl de 0.5% de metilcelulosa, 8µL de 3-10 Pharmalyte, 2µl de marcador de pI alto y 2µl de marcador de pI bajo a un volumen final de 200µl. La Tabla 6 muestra el porcentaje del producto de anticuerpo de las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, y 219R45-MB-21R83AG.129.003 después de la cromatografía de afinidad de Proteína A como es determinado

por SEC-HPLC. La Tabla 6 también muestra el porcentaje de los anticuerpos heterodiméricos de las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, y 219R45-MB-21R83AG.129.003 después de la cromatografía de afinidad de Proteína A como es analizado por icIEF.

Tabla 6

Línea de células	Titulación del Anticuerpo (g/L)	Pureza por SEC (%)	Pureza por IEF (% de heterodímero)
219R45-MB-21M18.010.017	3.0	73.9	47.2
219R45-MB-21R79.017.002	0.8	79.3	72.5
219R45-MB-21R75.101	0.4	91.2	84.9
219R45-MB-21R83.113	0.4	91.8	91.4
219R45-MB-21M18.138.007	1.0	92.6	95.8
219R45-MB-21M18AG.038.009	1.6	89.6	89.0
219R45-MB-21M18AG.142.002	2.6	91.2	84.6
219R45-MB-21R79AG.072.014	2.1	87.8	84.9
219R45-MB-21R83AG.129.003	2.4	89.4	90.5

La pureza del producto de anticuerpo biespecífico se puede incrementar adicionalmente por etapas de cromatografía adicionales. Después de la cromatografía de afinidad de Proteína A, la fracción de eluato se mantuvo en un pH bajo por no menos de 60 minutos a temperatura ambiente para la inactivación viral. La solución de anticuerpos (eluato de columna de Proteína A, pH ajustado) se cargó sobre una columna de intercambio aniónico potente. Las impurezas relacionadas con el producto y proceso ligadas a la resina de cromatografía de intercambio aniónico y a la fracción de flujo pasante (producto de anticuerpo) se recolectó. En algunos casos, la pureza se mejoró adicionalmente mediante el uso de una resina de cromatografía multimodal tal como hidroxiapatita de cerámica. En algunos casos, el intercambio de solución amortiguadora del producto de anticuerpo se llevó a cabo usando técnicas de ultrafiltración y diafiltración, después de lo cual los excipientes se agregaron. El anticuerpo formulado se filtró estéril en contenedores estériles y se almacenó refrigerado o congelado. La pureza de los anticuerpos biespecíficos se volvió a evaluar usando SEC-HPLC y IEF.

Tabla 7

Línea de células	Pureza por SEC (%)	Pureza por IEF (% de heterodímero)
219R45-MB-21M18.010.017	98.9	98.5
219R45-MB-21R79.017.002	95.1	99.3
219R45-MB-21R75.101	97.2	98.2
219R45-MB-21R83.113	95.3	91.4
219R45-MB-21M18.138.007	98.1	100
219R45-MB-21M18AG.142.002	99.6	100
219R45-MB-21R79AG.072.014	98.2	100
219R45-MB-21R83AG.129.003	998.6	100

Como se muestra en la Tabla 7, la purificación de los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 con etapas de cromatografía adicional después de la Proteína A dio por resultado el aislamiento de los productos de anticuerpo que fueron 95% a aproximadamente 99% puros como es analizado por SEC. El análisis por IEF determinó que el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 purificado de la línea de células 219R45-MB-21M18.010.017 fue de 98.5% heterodimérico,

el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R79.017.002 fue 99.3% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R75.101 fue 98.2% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R83.113 fue 91.4% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21M18.138.007 fue 100% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21M18AG.142.002 fue 100% heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R79AG.072.014 fue 100% heterodimérico, y el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R83AG.129.003 fue 100% heterodimérico. Estos resultados mostraron que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico incrementó en gran medida el porcentaje de anticuerpos heterodiméricos como es comparado con la purificación con la cromatografía de Proteína A sola. La adición de una etapa de cromatografía multi-modal tal como hidroxiapatita de cerámica también puede mejorar la pureza monomérica (como es determinado por SEP-HPLC).

Ejemplo 9

Inhibición del crecimiento tumoral de colon OMP-C8 en el modelo de recurrencia de tumor *in vivo*

Suspensiones de células individuales de xenoinjertos de

tumor de colon OMP-C8 (20,000 células) se inyectaron cutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 240mm^3. Los ratones se eligieron al azar (n = 10 por grupo) y se trataron con anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, una combinación de anticuerpos 21M18 y bevacizumab, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79, o el anticuerpo de control, todos en combinación con irinotecano. Los anticuerpos y el irinotecano se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se dosificaron a 7.5mg/kg, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se dosificaron a 15mg/kg, y el irinotecano se dosificó a 45mg/kg. El irinotecano se dosificó durante cuatro semanas, tiempo en el cual, se descontinuó y la administración de los anticuerpos continuó. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como se muestra en la Figura 9, el anticuerpo anti-hDLL4 21M18 continuó mostrando crecimiento tumoral después de que se detuvo el tratamiento con irinotecano. En contraste, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab no fue capaz de inhibir el

crecimiento de nuevo del tumor después de que se había detenido la administración de irinotecano. La combinación del anticuerpo anti-DLL4 21M18 y el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab dio por resultado mayor inhibición del crecimiento de nuevo del tumor que cualquier agente solo. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 fue más efectivo en inhibir el crecimiento de nuevo del tumor que la mezcla de los dos anticuerpos.

Ejemplo 10

Reducción en la tumorigenicidad de tumores de colon OMP-C8

Suspensiones de células individuales de xenoinjerto de tumor de colon OMP-C8 (20,000 células) se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 300mm^3. Los ratones se eligieron al azar (n = 5 por grupo) y se trataron con anticuerpo anti-DLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, una combinación de anticuerpos 21M18 y bevacizumab, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79, o el anticuerpo de control, ya sea en combinación con irinotecano o sin irinotecano. Los anticuerpos e irinotecanos se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se dosificaron a 7.5mg/kg, los

anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se dosificaron a 15mg/kg, e el irinotecano se dosificó a 45mg/kg. Los tumores se recolectaron después de 4 semanas, se procesaron en suspensiones de células individuales, y las células tumorales humanas se aislaron. 150 células tumorales de cada grupo experimental se inyectaron subcutáneamente en un nuevo cohorte de ratones (n = 10 por grupo) y los tumores se dejaron desarrollar sin tratamiento. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos.

Los volúmenes de tumor individuales en el día 68 se muestran en la Figura 10. El anticuerpo anti-DLL4 21M18, la combinación de 21M18 con el anticuerpo unanti-VEGF bevacizumab, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, y el irinotecano redujeron la frecuencia del crecimiento tumoral como agentes individuales. En contraste, el bevacizumab anti-VEGF como un solo agente no tuvo efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral como es comparado con el anticuerpo de control. En los grupos tratados con una combinación de irinotecano y anticuerpos, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tuvo el efecto más grande en la reducción de la frecuencia del crecimiento tumoral.

Ejemplo 11

Inhibición del crecimiento tumoral del colon OMP-C8 *in vivo*

Suspensiones de células individuales de xenoinjertos de

tumor de colon OMP-C8 (50,000 células) se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6.8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 21 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 80mm^3. Los ratones se eligieron al azar (n = 8 por grupo) y se trataron con el anticuerpo anti-DLL4 21M18, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R83, o el anticuerpo de control, ya sea solos o en combinación con irinotecano. Los anticuerpos y el irinotecano se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. El bevacizumab y los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, y 219R45-MB-21R83 se dosificaron en 15mg/kg, y el irinotecano se dosificó a 7.5mg/kg. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como agentes individuales, los cuatro anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 mostraron actividad anti-tumor mejorada relativa con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab. En combinación con el irinotecano, el tratamiento con los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R83 dio por resultado la inhibición más grande del crecimiento tumoral (Figura 11).

Después de la fase de tratamiento, las secciones de tumor se prepararon y se analizaron por tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Los tumores tratados con 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R83 en combinación con irinotecano mostraron regiones de tinción rosadas oscuras que proporcionan evidencia de calificación extensiva. Esto es característico del tejido tumoral sumamente necrótico.

Ejemplo 12

Estudio de toxicidad no de GLP de anticuerpos biespecíficos en monos cynomolgus

Un estudio de toxicidad no GLP en monos cynomolgus se inició para evaluar y comparar el perfil de toxicidad de algunos de los anticuerpos biespecíficos. Los animales se dosificaron con 0 mg/kg (control), 5 mg/kg (dosis baja), o 30 mg/kg (dosis alta) de anticuerpo biespecífico anti-DLL4/anti-VEGF (219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R83, o 219R45-MB-21R79) cada 2 semanas a través de infusión IV. 3 mujeres y 3 hombres se dosificaron en cada grupo. Después de 15 semanas, los pesos corporales medios fueron menores en los animales que recibieron la dosis alta de 219R45-MB-21R79 que en animales que recibieron la dosis alta de ya sea 219R45-MB-21R18 o 219R45-MB-21R83. Además, los niveles de albúmina de suero medios fueron menores en animales que recibieron 219R45-MB-21R79 que en aquellos que recibieron ya sea 219R45-MB-21R18 o 219R45-MB-21R83. Aunque preliminares en carácter, estos

resultados tempranos sugieren que 219R45-MB-21R18 y 219R45-MB-21R83 pueden tener un perfil de toxicidad superior comparados con 219R45-MB-21R79.

Se va a entender que los ejemplos y modalidades descritos en la presente son para propósitos ilustrativos solamente y que varias modificaciones o cambios en vista de los mismos serán sugeridos a personas expertas en el campo y se van a incluir dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud.

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente, sitios de internet, y números de acceso/secuencias de bases de datos incluyendo tanto secuencias de polinucleótidos y polipéptidos citadas en la presente se incorporan por este medio a manera de referencia en la presente en su totalidad para todos los propósitos al mismo grado como si cada publicación individual, patente, solicitud de patente, sito de internet, o número de acceso/secuencia de base de datos se indicó específica e individualmente para ser incorporada de esta manera a manera de referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 21M18 (SEQ ID NO:1)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 21R79 (SEQ ID NO:2)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 219R45 (SEQ ID NO:3)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:4)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWF
QQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPW
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21M18 (SEQ ID NO:5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R79 (SEQ ID NO:6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 219R45 (SEQ ID NO:7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:8)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

Región variable de cadena pesada 21R79 (SEQ ID NO:10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

Región variable de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVSS

Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:12)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS

GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

CDR1 de cadena pesada 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:13)

TAYYIH

CDR1 de cadena pesada alteARNtiva 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:79)

AYYIH

CDR2 de cadena pesada 21R79 (SEQ ID NO:14)

YIANYNRATNYNQKFKG

CDR2 de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:15)

YISSYNGATNYNQKFKG

CDR3 de cadena pesada 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:16)

RDYDYDVGMDY

CDR1 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:17)

NYWMH

CDR2 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:18)

DINPSNGRTSYKEKFKR

CDR3 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:19)

HYDDKYYPLMDY

CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:20)

RASESVDNYGISFMK

CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:21)

AASNQGS

CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:22)

QQSKEVPWTFGG

DLL4 humano con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:23)

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
GDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL
CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCE
HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR
GPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS
IDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVG

DLL4 humano sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:24)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL
SCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCST
PWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELS
ECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANY
ACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCAR
NPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVC
NCPYGFVGSRCEFPVG

Región N-Terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO:25)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT

NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ GSLAVGQN

Dominio DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO:26)

WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG EYC

VEGF humano-A con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:27)

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVD IFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPG PHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

VEGF humano-A sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:28)

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGC CNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG KGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSC KNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21M18 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:29)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT GGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTACAAC CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATG GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCCTCC ACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC

TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT

AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21R79 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:30)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC

TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCACCA

GGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTACAAC

CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTACATG

GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCCGCCTCC

ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC

TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT

AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21R79 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:31)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 219R45 (13A Versión 1) (SEQ ID NO:32)

ATGAAGCATCTGTGGTTTTTCCTGTTGCTCGTGGCGGCACCCAGATGGGTGTTGTCCCAA

GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTATCG

TGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCTCCG

GGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATATAAG

GAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTACATG

GAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTATGAT

GACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCCAGC

GCGTCGACGAAAGGTCCCTCGGTATTTCCCCTCGCCCCCTGCTCGAGGTCGACATCCGAA

TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCGGTAACGGTGTCG

TGGAACTCGGGAGCGCTTACGTCCGGAGTCCACACATTTCCGGCGGTACTGCAATCCTCG

GGACTGTATTCGTTGTCGTCAGTGGTGACTGTCCCGTCCTCCAATTTCGGGACTCAGACC

TATACGTGCAACGTCGACCACAAACCCTCAAACACCAAGGTGGATAAGACAGTGGAGCGC

AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCGTGTCCGGCACCCCCTGTCGCCGGACCCTCAGTCTTT

TTGTTTCCGCCGAAGCCCAAAGATACACTCATGATCTCAAGAACGCCCGAGGTAACATGC

GTGGTGGTCGATGTAAGCCACGAGGATCCAGAAGTACAATTCAATTGGTATGTAGACGGG

GTCGAGGTCCATAACGCAAAGACGAAACCGAGGGAAGAGCAGTTCAATTCGACTTTCCGG

GTGGTGTCGGTGCTTACAGTCGTACATCAGGACTGGTTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGT

AAAGTATCGAATAAGGGCCTTCCAGCGCCGATTGAAAAGACCATCTCCAAGACCAAAGGA

CAGCCACGAGAGCCGCAAGTCTATACGCTTCCTCCCAGCCGAGAAAAGATGACTAAAAAC

CAGGTATCGCTTACGTGTCTCGTCAAGGGTTTCTACCCTTCGGACATCGCGGTGGAATGG

GAGAGCAATGGACAACCGGAAAACAACTACAAGACGACACCGCCTATGTTGAAAAGCGAT

GGATCGTTTTTCCTCTATTCGAAACTCACGGTCGATAAGTCACGGTGGCAGCAGGGGAAT

GTGTTCTCCTGTTCAGTGATGCACGAGGCGCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG

TCACTTTCCCCGGGAAAATGA

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 219R45 (13A Versión 2) (SEQ ID NO:33)

ATGAAGCACCTCTGGTTCTTCCTGCTCCTCGTGGCTGCTCCTCGGTGGGTCCTCTCCCAA

GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTCTCC

TGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCT

GGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTACAAG

GAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTACATG

GAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTACGAC

GACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCCAGC

GCTTCCACAAAAGGACCCTCCGTCTTTCCCCTCGCCCCCTGCTCCCGGTCCACATCCGAA

TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCTGTCACAGTGTCC

TGGAACTCCGGAGCTCTCACATCCGGAGTCCACACATTTCCTGCTGTGCTCCAATCCTCC

GGACTGTATTCCCTCTCCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAATTTCGGGACACAGACC

TATACATGCAACGTGGACCACAAACCCTCCAACACCAAAGTCGATAAGACAGTGGAGCGC

AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCTTGTCCTGCTCCCCCTGTGGCTGGACCTTCCGTCTTT

CTGTTTCCTCCTAAACCTAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGC

GTGGTCGTCGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCCAATTTAATTGGTATGTGGACGGG

GTGGAGGTCCATAACGCTAAGACCAAACCTAGGGAAGAGCAGTTCAATTCCACTTTCCGG

GTGGTGTCCGTGCTGACCGTCGTTCATCAGGACTGGCTCAACGGGAAAGAATACAAATGC

AAAGTCTCTAATAAGGGCCTCCCTGCTCCTATTGAAAAAACAATTTCCAAAACAAAAGGA

CAACCTCGGGAGCCTCAAGTCTACACACTGCCACCTTCCCGGGAAAAAATGACAAAAAAT

CAAGTCTCCCTCACATGTCTCGTCAAGGGATTCTACCCTTCCGACATTGCTGTGGAATGG

GAATCCAATGGACAACCTGAAAACAACTACAAGACAACACCTCCTATGCTCAAAAGCGAT

GGGTCCTTTTTCCTCTATTCCAAACTCACAGTCGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGGAAT

GTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG

TCCCTCTCCCCTGGAAAATGA

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera (SEQ ID NO:34)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC

ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC

CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT

GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC

TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG

ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC

ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTCGTGTGCCTGCTG

AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC

GGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC

TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG

ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGTTAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:35)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC

CCTGGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 (13B) (SEQ ID NO:36)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCA

CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada

21R79 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:37)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 (13A versión 1) (SEQ ID NO:38)

CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTA
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCT
CCGGGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATAT
AAGGAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTAC
ATGGAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTAT
GATGACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCC
AGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 (13A Versión 2) (SEQ ID NO:39)

CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTC
TCCTGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCT
CCTGGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTAC
AAGGAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTAC
ATGGAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTAC
GACGACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCC
AGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:40)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

Región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:41)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG2 humana (SEQ ID NO:42)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG3 humana (SEQ ID

NO:43)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE
ALHNRFTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG4 humana (SEQ ID NO:44)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Péptido FLAG (SEQ ID NO:45)

DYKDDDDK

Cadena pesada 21R79 parenteral con cadena no modificada de secuencia señal subrayada (SEQ ID NO:46)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de 219R45 parenteral con secuencia señal subrayada (SEQ ID NO:47)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada 21R79 parenteral sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:48)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada 21R45 sin secuencia señal (SEQ ID NO:49)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY

KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS

SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF

RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 parenteral (SEQ ID NO:50)

CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATC

TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCG

CCAGGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTAT

AACCAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTAC

ATGGAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTAC

GACTATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 parenteral (SEQ ID NO:51)

CAGGTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTC

AGCTGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCC

CCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTAT

AAGGAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTAC

ATGGAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTAT

GACGATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGC

AGC

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R79 parenteral(SEQ ID NO:52)

ATGAAACACTTGTGGTTTTTCCTCTTGCTCGTGGCAGCTCCTCGGTGGGTACTTTCACAA
GTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATCTCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCGCCA
GGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTATAAC
CAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTACATG
GAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTACGAC
TATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCCGCCAGC
ACCAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGT
TGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG

TCTCCGGGTAAA

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 219R45 parenteral (SEQ ID NO:53)

ATGAAACACCTCTGGTTCTTTTTGCTCCTGGTGGCAGCTCCCCGATGGGTGCTTAGCCAG
GTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTCAGC
TGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCT
GGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTATAAG
GAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTACATG
GAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTATGAC
GATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGCAGC
GCGTCCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC

GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC

TCCCTGTCTCCGGGTAAA

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera 21R79 y 219R45 parenteral (SEQ ID NO:54)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC

ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC

CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC

GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC

AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG

ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera 21R79 y 219R45 parenteral (SEQ ID NO:55)

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGG

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC

ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC

CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC

GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC

AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG

ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCCCTCCGTCTTC

ATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAAAGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG

AATAACTTCTATCCCCGGGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAAGC

GGCAACTCCCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC

AGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC

ACCCATCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTTGA

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R75 (SEQ ID

NO:56)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal predicha 21R75 (subrayada) (SEQ ID NO:57)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIAGYKDATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región variable de cadena pesada 21R75 (SEQ ID NO:58)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

CDR2 de cadena pesada 21R75 (SEQ ID NO:59)

YIAGYKDATNYNQKFKG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:60)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión 1T) (SEQ ID NO:77)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión S1-2) (SEQ ID NO:61)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAG

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R83 (SEQ ID NO:62)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal predicha 21R83 (subrayada) (SEQ ID NO:63)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISNYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región variable de cadena pesada 21R83 (SEQ ID NO:64)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY

NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

CDR2 de cadena pesada 21R83 (SEQ ID NO:65)

YISNYNRATNYNQKFKG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 1) (SEQ ID NO:66)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC

TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT

GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC

CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG

GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC

ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC

TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC

CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC

CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC

AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA

TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 1T) (SEQ ID NO:78)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC

TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT

GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC

CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG

GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC

ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC

GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC

TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG

TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC

TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC

CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG

GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA

GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG

TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC

CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC

AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA

TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG

AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 subrayada (13B Versión S1-2) (SEQ ID NO:67)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:68)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC

CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:69)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA

AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA

CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT

AACCAAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC

ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R83 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:70)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC

TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC

CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTAC

AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC

GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:71)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA

AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA

CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT

AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC

ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 2) (SEQ ID NO:72)

<u>ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCG</u>CAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R83 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:73)

CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA

AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA

CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTAT

AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC

ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 subrayada (13B Versión 2) (SEQ ID NO:74)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG

GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT

TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA

GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC

CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG

GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT

TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC

ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC

TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA

TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC

TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC

TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC

CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT

GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG

GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT

TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG

TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT

CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT

AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21M18 (versión 2) (SEQ ID NO:75)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA

TCTCCTGGCAAGTAG

Región variable de cadena pesada 21M18 (versión 2) (SEQ ID NO:76)

CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGTTGC
AAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCAGGA
CAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAACCAA
AAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATGGAA
TTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGATTAT
GATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia consenso de cadena pesada CDR2 de cadena pesada Anti-DLL4 (SEQ ID NO:80):

$YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$, donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente a VEGF humano, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 12.

5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11; y

(b) una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

6. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al VEGF humano, caracterizado porque comprende:

(a) una cadena pesada que consiste esencialmente de f SEQ ID NO:49 o SEQ ID NO:7; y

(b) una cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:8.

7. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF.

8. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el receptor VEGF es VEGFR-1 o VEGFR-2.

9. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque modula la

angiogénesis.

10. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al ligando 4 similar a delta humano (DLL4), caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14) y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

11. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al ligando 4 similar a delta humano (DLL4), caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59) y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al ligando 4 similar a delta humano (DLL4), caracterizado

porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65) y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO: 20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

13. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 12.

14. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(b) una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

15. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ

ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, o SEQ ID NO:62; y

(b) una cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:8.

16. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-15, caracterizado porque inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch.

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el receptor Notch se selecciona del grupo que consiste de Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4.

18. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-17, caracterizado porque inhibe la señalización Notch.

19. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-18, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal.

20. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-19, caracterizado porque es un anticuerpo recombinante.

21. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado porque es un anticuerpo quimérico.

22. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, caracterizado porque es un anticuerpo humanizado.

23. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, caracterizado porque es un anticuerpo humano.

24. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, caracterizado porque un anticuerpo biespecífico.

25. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque es un anticuerpo IgG1.

26. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque es un anticuerpo IgG2.

27. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de ligación a anfígeno.

28. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende:

a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a VEGF humano, y

b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano,

en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena

pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19);

en donde el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

29. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14).

30. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 15).

31. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59).

32. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65).

33. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(c) una primera y segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

34. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

35. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 10; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

36. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

37. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena

ligera tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

38. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO:9; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

39. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 10; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

40. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO:58; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena

ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

41. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque

(a) la primera región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO: 11;

(b) la segunda región variable de cadena pesada consiste esencialmente de SEQ ID NO:64; y

(c) la primera y la segunda regiones variables de cadena ligera consiste esencialmente de SEQ ID NO: 12.

42. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-41, caracterizado porque comprende un primer dominio CH3 y un segundo dominio CH3, cada uno de los cuales se modifica para promover la formación de heteromultímeros.

43. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el primero y segundo dominios CH3 se modifica basado en los efectos electrostáticos.

44. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-43, caracterizado porque comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los

aminoácidos son lisina.

45. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-43, caracterizado porque comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato.

46. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el primero y segundo dominio CH3 se modifican usando una técnica de perillas en los agujeros.

47. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:5, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

48. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:6, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

49. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:56, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

50. Un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:62, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

51. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un fragmento N-terminal de DLL4 humano (aminoácidos 1-191 de SEQ ID NO:24).

52. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un epítopo que comprende aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25.

53. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un epítopo que comprende aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25.

54. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a un epítopo que comprende aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25 y aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25.

55. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-46, caracterizado porque el primer sitio de ligación a antígeno se liga a VEGF

humano con una K_D de aproximadamente 100nM o menor y el segundo sitio de ligación a antígeno se liga a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente l00nM o menor.

56. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste de 219R45-MB-21M18, 219R45-MB- 21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83.

57. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-56, caracterizado porque inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF.

58. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el receptor VEGF es VEGFR-1 o VEGFR-2.

59. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-58, caracterizado porque inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch.

60. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque el receptor Notch se selecciona del grupo que consiste de Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4.

61. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-60, caracterizado porque inhibe la señalización Notch.

62. El anticuerpo biespecífico de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 28-61, caracterizado porque modula la angiogénesis.

63. Un polipéptido, caracterizado porque comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

64. Una célula, caracterizada porque comprende el anticuerpo o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-63.

65. Una célula, caracterizada porque produce el anticuerpo o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-63.

66. La molécula de polinucleótido aislada, caracterizada porque comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-63.

67. Una molécula de polinucleótido aislada, caracterizada porque comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID

NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78.

68. Un vector, caracterizado porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 66 o la reivindicación 67.

69. Una célula, caracterizada porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 66 o la reivindicación 67 o el vector de conformidad con la reivindicación 68.

70. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-62, y un portador farmacéuticamente aceptable.

71. Un método para modular la angiogénesis en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

72. Un método para inhibir el crecimiento de un tumor, caracterizado porque comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

73. Un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

74. Un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

75. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 72-74, caracterizado porque el tumor se selecciona del grupo que consiste de tumor colorectal, tumor de colon, tumor de ovario, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de la vejiga, glioblastoma, y tumor de cabeza y cuello.

76. Un método para tratar cáncer en un sujeto,

caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o un anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28-62.

77. El método de conformidad con la reivindicación 76, caracterizado porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, el linfoma y leucemia.

78. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 71-77, caracterizado porque además comprende administrar un segundo agente terapéutico.

79. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

80. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque el segundo agente terapéutico es un segundo anticuerpo.

81. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 71 o 73-80, caracterizado porque el sujeto es humano.

82. Un método para la producción de un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende expresar por lo menos un polinucleótido de conformidad con la reivindicación 66 o reivindicación 67, en una célula.

83. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque la célula es una célula procariótica o una célula eucariótica.

84. El método de conformidad con la reivindicación 82 o la reivindicación 83, caracterizado porque además comprende aislar el anticuerpo biespecífico de la célula o el sobrenadante del cultivo celular.

85. Un anticuerpo que comprende un primer sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano, caracterizado porque el primer sitio de ligación a antígeno comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX1X2YX3X4ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

86. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación

85, caracterizado porque es un anticuerpo biespecífico y comprende además un segundo sitio de ligación a antígeno, en donde el segundo sitio de ligación a antígeno se liga específicamente al VEGF humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

87. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende (a) un primer sitio de ligación a antígeno que se liga a VEGF humano con una K_d entre aproximadamente 0.1nM y aproximadamente 1.0 nM y (b) un segundo sitio de ligación a antígeno que se liga específicamente a DLL4 humano con una K_D entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 20 nM.

88. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85-87, y un portador farmacéuticamente aceptable.

89. Un método para tratar cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85-87.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a agentes de ligación a VEGF, agentes de ligación a DLL4, agentes de ligación biespecíficos a VEGF/DLL4, y métodos para usar los agentes para tratar enfermedades tales como cáncer. La presente invención proporciona anticuerpos que se ligan específicamente a VEGF humano, anticuerpos que se ligan específicamente a DLL4 humano, y anticuerpos biespecíficos que se ligan específicamente a VEGF humano y/o DLL4 humano. La presente invención proporciona además métodos para usar los agentes para inhibir el crecimiento tumoral. También se describen métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o anticuerpo de la presente invención a un paciente que tiene un tumor o cáncer.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
28 March 2013 (28.03.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/044215 A9

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/056886

(22) International Filing Date:
24 September 2012 (24.09.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/538,454 23 September 2011 (23.09.2011) US
61/597,409 10 February 2012 (10.02.2012) US
61/692,978 24 August 2012 (24.08.2012) US

(71) Applicant: **ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) Inventors: **GURNEY, Austin, L.**; 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (US). **SATO, Aaron, Ken**; 1636 Albemarle Way, Burlingame, CA 94010 (US). **BOND, Christopher, John**; 511 30th Avenue, San Mateo, CA 94403 (US).

(74) Agents: **CALVO, Paul, A.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox, PLLC, 1100 New York Avenue, NW, Washington, DC 20005 (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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, 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))*

— *with amended claims (Art. 19(1))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

(48) Date of publication of this corrected version:
3 April 2014

(15) Information about Correction:
see Notice of 3 April 2014

WO 2013/044215 A9

(54) Title: VEGF/DLL4 BINDING AGENTS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to VEGF-binding agents, DLL4-binding agents, VEGF/DLL4 bispecific binding agents, and methods of using the agents for treating diseases such as cancer. The present invention provides antibodies that specifically bind human VEGF, antibodies that specifically bind human DLL4, and bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and/or human DLL4. The present invention further provides methods of using the agents to inhibit tumor growth. Also described are methods of treating cancer comprising administering a therapeutically effect amount of an agent or antibody of the present invention to a patient having a tumor or cancer.

VEGF/DLL4 BINDING AGENTS AND USES THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention generally relates to antibodies and other agents that bind VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, particularly anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies, as well as to methods of using the antibodies or other agents for the treatment of diseases such as cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Angiogenesis plays an important role in the pathogenesis of a number of disorders, including solid tumors and metastasis. The production of new blood vessels is essential for providing oxygen and nutrients for the growth and spread of a tumor, and therefore angiogenesis is a good target for cancer therapeutics.

[0003] Angiogenesis involves a family of proteins acting as angiogenic activators, including vascular endothelial growth factor (VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, and their respective receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3). VEGF-A, also referred to as VEGF or vascular permeability factor (VPF), exists in several isoforms that arise from alternative splicing of mRNA of a single VEGF gene, with $VEGF_{165}$ being the most biologically relevant isoform.

[0004] Anti-VEGF antibodies have been shown to suppress the growth of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. A humanized anti-VEGF monoclonal antibody, bevacizumab (AVASTIN) has been developed and approved in the United States as a cancer therapeutic.

[0005] The Notch signaling pathway is a universally conserved signal transduction system. It is involved in cell fate determination during development including embryonic pattern formation and post-embryonic tissue maintenance. In addition, Notch signaling has been identified as a critical factor in the maintenance of hematopoietic stem cells.

[0006] The Notch pathway has been linked to the pathogenesis of both hematologic and solid tumors and cancers. Numerous cellular functions and microenvironmental cues associated with tumorigenesis have been shown to be modulated by Notch pathway signaling, including cell proliferation, apoptosis, adhesion, and angiogenesis (Leong et al., 2006, *Blood*, 107:2223-2233). In addition, Notch receptors and/or Notch ligands have been shown to play potential oncogenic roles in a number of human cancers, including acute myelogenous leukemia, B cell chronic lymphocytic leukemia, Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, T-cell acute lymphoblastic leukemia, brain cancer, breast cancer, cervical cancer, colon cancer, lung cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, and skin cancer. (Leong et al., 2006, *Blood*, 107:2223-2233).

[0007] Delta-like 4 ligand (DLL4) is an important component of the Notch pathway and has been identified as a target for cancer therapy. DLL4 is a Notch ligand, characterized by an N-terminal domain,

a Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) domain and tandem EGF-like repeats within the extracellular domain. It has been reported that DLL4 is induced by VEGF and that DLL4 may act as a negative feedback regulator for vascular proliferation.

[0008] Anti-DLL4 antibodies have been shown to enhance angiogenic sprouting and branching which leads to non-productive angiogenesis and decreased tumor growth (Noguera-Troise et al., 2006, *Nature*, 444:1032-1037). In addition, an anti-DLL4 antibody, 21M18, has been shown to inhibit tumor growth and reduce the frequency of cancer stem cells in xenograft tumor models (Hoey et al., 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-177; U.S. Patent No. 7,750,124).

[0009] Although there have been significant strides in development of monoclonal antibodies for use in cancer treatments, there is still great potential for further improvements. One class of antibody molecules with the promise of enhanced potency and/or reduced side effects (e.g., toxicity) is bispecific antibodies.

[0010] Early bispecific molecules were mainly generated using chemical cross-linking of two antibodies, or were hybrid hybridomas or "quadromas". One success of the quadroma format is triomabs, which are mouse/rat combinations that demonstrate a preferential species-specific heavy/light chain pairing. More recently, advances in antibody engineering have provided a wide variety of new antibody formats, including, but not limited to, tandem scFv (bi-scFv), diabodies, tandem diabodies (tetra-bodies), single chain diabodies, and dual variable domain antibodies.

[0011] It is one of the objectives of the present invention to provide improved molecules for cancer treatment, particularly bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and human DLL4.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides binding agents, such as antibodies, that bind VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4 (VEGF/DLL4-binding agents), as well as compositions, such as pharmaceutical compositions, comprising the binding agents. Binding agents that bind VEGF or DLL4, as well as at least one additional antigen or target, and pharmaceutical compositions of such binding agents, are also provided. In certain embodiments, the binding agents are novel polypeptides, such as antibodies, antibody fragments, and other polypeptides related to such antibodies. In certain embodiments, the binding agents are antibodies that specifically bind human VEGF. In some embodiments, the binding agents are antibodies that specifically bind human DLL4. In some embodiments, the binding agents are bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and human DLL4. The invention further provides methods of inhibiting the growth of a tumor by administering the binding agents to a subject with a tumor. The invention further provides methods of treating cancer by administering the binding agents to a subject in need thereof. In some embodiments, the methods of treating cancer or inhibiting tumor growth comprise targeting cancer stem cells with the binding agents. In certain embodiments, the methods comprise reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, reducing the number of cancer stem cells in a

tumor, reducing the tumorigenicity of a tumor, and/or reducing the tumorigenicity of a tumor by reducing the number or frequency of cancer stem cells in the tumor.

[0013] In one aspect, the invention provides a binding agent, such as an antibody, that specifically binds human VEGF. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of VEGF to VEGFR-1 and/or VEGFR-2. In some embodiments, the binding agent modulates angiogenesis. In certain embodiments, the antibody or other binding agent further specifically binds to and/or inhibits human DLL4 in addition to human VEGF.

[0014] In some embodiments, the binding agent is an antibody which comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0015] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent comprises a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent comprises a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:11; and/or a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0016] In some embodiments, the binding agent is antibody 219R45, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, or 219R45-MB-21R83.

[0017] In another aspect, the invention provides a binding agent, such as an antibody, that specifically binds human DLL4. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor. In some embodiments, the binding agent inhibits binding of DLL4 to Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4. In some embodiments, the binding agent inhibits Notch signaling. In some embodiments, the binding agent promotes unproductive angiogenesis. In certain embodiments, the antibody or other binding agent further specifically binds to and/or inhibits human VEGF in addition to human DLL4.

[0018] In some embodiments, the binding agent is an antibody that binds human DLL4 and comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid ,

and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0019] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and/or a light chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:10; and a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0020] In some embodiments, the binding agent is antibody 21R79 or antibody 219R45-MB-21R79.

[0021] In some embodiments, the binding agent is an antibody which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0022] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and/or a light chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:58; and a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0023] In some embodiments, the binding agent is antibody 21R75 or antibody 219R45-MB-21R75.

[0024] In some embodiments, the binding agent is an antibody which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0025] In certain embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least 90% or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain

embodiments, the binding agent is an antibody that comprises a heavy chain variable region of SEQ ID NO:64; and a light chain variable region of SEQ ID NO:12.

[0026] In some embodiments, the binding agent is antibody 21R83 or antibody 219R45-MB-21R83.

[0027] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects or embodiments, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the binding agent is a bispecific antibody. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF and a second target. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human DLL4 and a second target. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds both human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody modulates angiogenesis. In certain embodiments, the bispecific antibody inhibits Notch signaling. In some embodiments, the bispecific antibody modulates angiogenesis and inhibits Notch signaling. In some embodiments, the bispecific antibody reduces the number of frequency of cancer stem cells. In certain embodiments, the bispecific antibody comprises two identical light chains. In certain embodiments the bispecific antibody is an IgG antibody (e.g., IgG2).

[0028] In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0029] In certain embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein

the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the the bispecific antibody comprises: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0030] In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS

(SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the a bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0031] In some embodiments, the bispecific antibody that specifically binds human VEGF, and comprises: a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11, and/or a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF, and comprises: a heavy chain

variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, and/or a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0032] In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human DLL4, and comprises: a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human DLL4, and comprises: a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0033] In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF and human DLL4, and comprises: (a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises (a) a first heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; (b) a second heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and (c) a first and a second light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0034] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1 nM and about 1.0 nM and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM. In certain embodiments, the bispecific antibody comprises two identical light chains.

[0035] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

[0036] In certain embodiments of each of the aforementioned aspects, as well as other aspects and/or embodiments described elsewhere herein, the binding agent or antibody is isolated.

[0037] In another aspect, the invention provides a polypeptide selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In some embodiments, the polypeptide is isolated. In certain embodiments, the polypeptide is substantially pure. In certain embodiments, the polypeptide is an antibody or part of an antibody, such as an antibody fragment.

[0038] In another aspect, the invention provides isolated polynucleotide molecules comprising a polynucleotide that encodes the binding agents and/or polypeptides of each of the aforementioned aspects, as well as other aspects and/or embodiments described herein. In some embodiments, the polynucleotide comprises a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, and SEQ ID NO:74. The invention further provides expression vectors that comprise the polynucleotides, as well as cells that comprise the expression vectors and/or the polynucleotides. In some embodiments, the cell is a prokaryotic cell or a eukaryotic cell.

[0039] In other aspects, the invention provides methods of inhibiting growth of a tumor, comprising contacting the tumor with an effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0040] In another aspect, the invention provides a method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0041] In another aspect, the invention provides a method of modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0042] In another aspect, the invention provides a method of reducing the tumorigenicity of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or

other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0043] In another aspect, the invention provides a method of reducing the tumorigenicity of a tumor in a subject by reducing the frequency of cancer stem cells in the tumor, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0044] In other aspects, the invention provides methods of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody (or other binding agent) that binds VEGF, DLL4, or both VEGF and DLL4, including each of those antibodies (or other binding agents) described herein.

[0045] Pharmaceutical compositions comprising a binding agent (e.g., antibody) described herein and a pharmaceutically acceptable carrier are further provided, as are cell lines that express and/or produce the binding agents. Methods of treating cancer and/or inhibiting tumor growth in a subject (e.g., a human) comprising administering to the subject an effective amount of a composition comprising the binding agents are also provided.

[0046] Where aspects or embodiments of the invention are described in terms of a Markush group or other grouping of alternatives, the present invention encompasses not only the entire group listed as a whole, but also each member of the group individually and all possible subgroups of the main group, and also the main group absent one or more of the group members. The present invention also envisages the explicit exclusion of one or more of any of the group members in the claimed invention.

BRIEF DESCRIPTIONS OF THE DRAWINGS

[0047] Figure 1. 1A) Heavy chain and light chain CDRs of anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21M79, 219R45-MB-21M75, and 219R45-MB-21M83; 1B) Heavy chain and light chain variable region SEQ ID NOs; 1C) Heavy chain and light chain SEQ ID NOs.

[0048] Figure 2. HTRF assay for simultaneous binding of bispecific antibodies to human VEGF and human DLL4. Results are reported in Relative Fluorescence Units (RFU), which represent the ratio of the relative fluorescence intensity at 665nm to the relative fluorescence intensity at 620nm. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 219R45 plus 21M18 (-▲-); 219R45 plus 21R79 (-□-); 219R45 (-▼-); 21M18 (-◊-); 21R79 (-○-); control antibody LZ-1 (-Δ-).

[0049] Figure 3. Inhibition of VEGF-induced HUVEC proliferation by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. Fluorescence intensity is read using an excitation wavelength of 530nm and an emission wavelength of 590. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-▲-); 219R45 (-■-); Medium with no VEGF (-◊-).

[0050] Figure 4. Inhibition of DLL4-induced Notch signaling by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. Luciferase activity was measured using a dual luciferase assay kit with firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity. 219R45-MB-21M18 (-●-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 21M18 (-○-); 21R79 (-□-).

[0051] Figure 5. Inhibition of colon tumor growth *in vivo* by an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody. OMP-C8 colon tumor cells were injected subcutaneously into a human skin graft in NOD/SCID mice. Mice were treated with control antibody (-■-), anti-hDLL4 antibody 21M18 (-▲-), anti-VEGF antibody bevacizumab (-○-), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 (-▼-). Data is shown as tumor volume (photons/sec) over days post-treatment. Antibodies were administered intraperitoneally at a dose of 25mg/kg once a week.

[0052] Figure 6. Tumorigenicity of pancreatic tumor cells after treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. OMP-PN8 tumor cells from mice treated with control antibody, anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 or 219R45-MB-21R79 with or without gemcitabine were processed to single cell suspensions, and serially transplanted into mice. 90 cells from each treatment group were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow with no treatment. Data is shown as tumor volume (mm^3) on day 55. Tumor frequency is shown as number of tumors over total number of mice injected in each group.

[0053] Figure 7. Bispecific antibody ELISA. Bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 were diluted in blocking buffer (1x PBS, 0.1% gelatin, 0.1% Polysorbate-20, pH 7.4) containing 2µg/ml biotin-DLL4-hFc. The antibodies were serially diluted 3-fold from 500ng/ml to 0.008ng/ml. The antibody samples were incubated for 2 hours in blocking buffer containing the biotin-DLL4-hFc. After incubation, the antibody samples were transferred to a VEGF-coated assay plate (100 ul/well) and incubated for 2 hours. Streptavidin-HRP was added to each well and incubated for 1 hr. TMB substrate was added to the wells with a 10 minute color development and the reaction was stopped with 2M sulfuric acid. Absorbance was read at 450–650nm and the data analyzed using the 4-parameter fit within the Softmax Pro analysis program.

[0054] Figure 8. Imaged capillary isoelectric focusing of anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies.

[0055] Figure 9. Inhibition of colon tumor growth by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies in tumor recurrence model. OMP-C8 colon tumor cells were injected subcutaneously in NOD/SCID mice. Mice were treated with control antibody (-■-), anti-hDLL4 antibody 21M18 (-●-), anti-VEGF antibody bevacizumab (-▲-), a combination of 21M18 and bevacizumab (-▼-), anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 (-◊-), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79 (-○-), all in combination with irinotecan. Antibodies 21M18 and bevacizumab were administered intraperitoneally at a dose of 7.5mg/kg once a week, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and

219R45-MB-21R79 were administered intraperitoneally at a dose of 15mg/kg once a week, and irinotecan was administered for the first 4 weeks at a dose of 45mg/kg. Data are shown as tumor volume (mm^3) over days post-treatment.

[0056] Figure 10. Tumorigenicity of OMP-C3 colon tumor cells after treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. Tumors from mice treated with control antibody, anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, a combination of 21M18 and bevacizumab, or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 or 219R45-MB-21R79 with or without irinotecan were processed to single cell suspensions, and serially transplanted into mice. 150 cells from each treatment group were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow with no treatment. Data are shown as tumor volume (mm^3) on day 68.

[0057] Figure 11. Inhibition of colon tumor growth *in vivo* by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies. OMP-C8 colon tumor cells were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. Mice were treated with control antibody (-■-), anti-VEGF antibody bevacizumab (-▲-), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 (-◊-), 219R45-MB-21R75 (-●-), 219R45-MB-21R79 (-○-), or 219R45-MB-21R83 (-▼-). Mice were treated with antibodies as single agents (Fig. 10A) or in combination with irinotecan (Fig. 10B). Antibodies were administered intraperitoneally at a dose of 15mg/kg once a week and irinotecan at a dose of 7.5mg/kg one a week. Data are shown as tumor volume (mm^3) over days post-treatment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0058] The present invention provides novel binding agents, including but not limited to polypeptides such as antibodies, that bind VEGF and/or DLL4 (e.g., a VEGF/DLL4 binding agent). Related polypeptides and polynucleotides, compositions comprising the VEGF/DLL4-binding agents, and methods of making the VEGF/DLL4-binding agents are also provided. Methods of using the novel VEGF/DLL4-binding agents, such as methods of inhibiting tumor growth, methods of treating cancer, methods of reducing tumorigenicity of a tumor, methods of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, and/or methods of modulating angiogenesis, are further provided.

[0059] A monoclonal antibody that specifically binds human VEGF has been identified, 219R45. This antibody has a binding affinity for human VEGF of about 0.67nM, and a binding affinity for mouse VEGF of about 23nM. Several monoclonal antibodies that specifically bind human DLL4 have been identified, 21R79, 21R75 and 21R83. Antibody 21R79 has a binding affinity for human DLL4 of less than 0.1nM. Bispecific antibodies that specifically bind human VEGF and human DLL4 have been produced, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 (CDR sequences in Figure 1). As used herein, the "MB" within an antibody name refers to "monovalent/bispecific". Bispecific antibody 219R45-MB-21M18 has a binding affinity for human

VEGF of less than 1.0nM and a binding affinity for human DLL4 of about 16nM. Bispecific antibody 219R45-MB-21R79 has a binding affinity for human VEGF of less than 1.0nM and a binding affinity for human DLL4 of less than 1.0nM. Bispecific antibody 219R45-MB-21R75 has a binding affinity for human DLL4 of about 5nM, while bispecific antibody 219R45-MB-21R83 has a binding affinity for human DLL4 of about 1nM. Bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 bind mouse VEGF (Example 1, Table 3). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies bind human VEGF and human DLL4 simultaneously (Example 2, Figure 2). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit VEGF-induced proliferation of HUVEC cells (Example 3, Figure 3). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit DLL4-induced Notch signaling (Example 4, Figure 4). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit tumor growth (Examples 5, 9, 11 and Figures 5, 9, 11). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies inhibit tumorigenicity (Examples 6 and 10 and Figures 6, 10). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies bind both VEGF and DLL4 in a bispecific ELISA (Example 7, Figure 7). Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies are isolated and purified to a product comprising at least 90% heterodimeric antibody (Example 8, Table 7).

I. Definitions

[0060] To facilitate an understanding of the present invention, a number of terms and phrases are defined below.

[0061] The term "antibody" as used herein refers to an immunoglobulin molecule that recognizes and specifically binds a target, such as a protein, polypeptide, peptide, carbohydrate, polynucleotide, lipid, or combinations of the foregoing, through at least one antigen recognition site within the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses intact polyclonal antibodies, intact monoclonal antibodies, single chain antibodies, antibody fragments (such as Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments), single chain Fv (scFv) antibodies, multispecific antibodies such as bispecific antibodies, monospecific antibodies, monovalent antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, human antibodies, fusion proteins comprising an antigen-binding site of an antibody, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site (i.e., antigen-binding site) as long as the antibodies exhibit the desired biological activity. An antibody can be any of the five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, or subclasses (isotypes) thereof (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, and IgA2), based on the identity of their heavy chain constant domains referred to as alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The different classes of immunoglobulins have different and well-known subunit structures and three-dimensional configurations. Antibodies can be naked or conjugated to other molecules, including but not limited to, toxins and radioisotopes.

[0062] The term "antibody fragment" refers to a portion of an intact antibody and refers to the antigenic determining variable regions of an intact antibody. Examples of antibody fragments include, but are not

limited to, Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments, linear antibodies, single chain antibodies, and multispecific antibodies formed from antibody fragments. "Antibody fragment" as used herein comprises an antigen-binding site or epitope-binding site.

[0063] The term "variable region" of an antibody refers to the variable region of an antibody light chain, or the variable region of an antibody heavy chain, either alone or in combination. The variable regions of the heavy and light chains each consist of four framework regions (FR) connected by three complementarity determining regions (CDRs), also known as "hypervariable regions". The CDRs in each chain are held together in close proximity by the framework regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of the antibody. There are at least two techniques for determining CDRs: (1) an approach based on cross-species sequence variability (i.e., Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, *5th Edition*, National Institutes of Health, Bethesda, MD), and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). In addition, combinations of these two approaches are sometimes used in the art to determine CDRs.

[0064] The term "monoclonal antibody" as used herein refers to a homogeneous antibody population involved in the highly specific recognition and binding of a single antigenic determinant or epitope. This is in contrast to polyclonal antibodies that typically include a mixture of different antibodies directed against a variety of different antigenic determinants. The term "monoclonal antibody" encompasses both intact and full-length monoclonal antibodies as well as antibody fragments (e.g., Fab, Fab', F(ab')2, Fv), single chain (scFv) antibodies, fusion proteins comprising an antibody portion, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site (antigen-binding site). Furthermore, "monoclonal antibody" refers to such antibodies made by any number of techniques, including but not limited to, hybridoma production, phage selection, recombinant expression, and transgenic animals.

[0065] The term "humanized antibody" as used herein refers to forms of non-human (e.g., murine) antibodies that are specific immunoglobulin chains, chimeric immunoglobulins, or fragments thereof that contain minimal non-human sequences. Typically, humanized antibodies are human immunoglobulins in which residues of the CDRs are replaced by residues from the CDRs of a non-human species (e.g., mouse, rat, rabbit, or hamster) that have the desired specificity, affinity, and/or binding capability (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). In some instances, the Fv framework region residues of a human immunoglobulin are replaced with the corresponding residues in an antibody from a non-human species that has the desired specificity, affinity, and/or binding capability. The humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residues either in the Fv framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or binding capability. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically

two or three, variable domains containing all or substantially all of the CDRs that correspond to the non-human immunoglobulin whereas all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Examples of methods used to generate humanized antibodies are described in, for example, U.S. Patent 5,225,539.

[0066] The term "human antibody" as used herein refers to an antibody produced by a human or an antibody having an amino acid sequence corresponding to an antibody produced by a human. A human antibody may be made using any of the techniques known in the art. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human CDRs.

[0067] The term "chimeric antibody" as used herein refers to an antibody wherein the amino acid sequence of the immunoglobulin molecule is derived from two or more species. Typically, the variable region of both light and heavy chains corresponds to the variable region of antibodies derived from one species of mammals (e.g., mouse, rat, rabbit, etc.) with the desired specificity, affinity, and/or binding capability, while the constant regions correspond to sequences in antibodies derived from another species (usually human).

[0068] The phrase "affinity-matured antibody" as used herein refers to an antibody with one or more alterations in one or more CDRs thereof that result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody that does not possess those alterations(s). The definition also includes alterations in non-CDR residues made in conjunction with alterations to CDR residues. Preferred affinity-matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity-matured antibodies are produced by procedures known in the art. For example, Marks et al., 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by Barbas et al., 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier et al., 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.*, 154:3310-9; and Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896. Site-directed mutagenesis may also be used to obtain affinity-matured antibodies.

[0069] The terms "epitope" and "antigenic determinant" are used interchangeably herein and refer to that portion of an antigen capable of being recognized and specifically bound by a particular antibody. When the antigen is a polypeptide, epitopes can be formed both from contiguous amino acids and noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids (also referred to as linear epitopes) are typically retained upon protein denaturing, whereas epitopes formed by tertiary folding (also referred to as conformational epitopes) are typically lost upon protein denaturing. An epitope typically includes at least 3, and more usually, at least 5 or 8-10 amino acids in a unique spatial conformation.

[0070] The terms "heteromultimeric molecule" or "heteromultimer" or "heteromultimeric complex" or "heteromultimeric polypeptide" are used interchangeably herein to refer to a molecule comprising at least a first polypeptide and a second polypeptide, wherein the second polypeptide differs in amino acid sequence from the first polypeptide by at least one amino acid residue. The heteromultimeric molecule can comprise a "heterodimer" formed by the first and second polypeptide or can form higher order tertiary structures where additional polypeptides are present.

[0071] The terms "antagonist" and "antagonistic" as used herein refer to any molecule that partially or fully blocks, inhibits, reduces, or neutralizes a biological activity of a target and/or signaling pathway (e.g., the Notch pathway). The term "antagonist" is used herein to include any molecule that partially or fully blocks, inhibits, reduces, or neutralizes the activity of a protein. Suitable antagonist molecules specifically include, but are not limited to, antagonist antibodies or antibody fragments.

[0072] The terms "modulation" and "modulate" as used herein refer to a change or an alteration in a biological activity. Modulation includes, but is not limited to, stimulating or inhibiting an activity. Modulation may be an increase or a decrease in activity (e.g., a decrease in angiogenesis or an increase in angiogenesis), a change in binding characteristics, or any other change in the biological, functional, or immunological properties associated with the activity of a protein, pathway, or other biological point of interest.

[0073] The terms "selectively binds" or "specifically binds" mean that a binding agent or an antibody reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration, with greater affinity, or with some combination of the above to the epitope, protein, or target molecule than with alternative substances, including unrelated proteins. In certain embodiments "specifically binds" means, for instance, that an antibody binds a protein with a K_D of about 0.1mM or less, but more usually less than about 1μM. In certain embodiments, "specifically binds" means that an antibody binds a target at times with a K_D of at least about 0.1μM or less, at other times at least about 0.01μM or less, and at other times at least about 1nM or less. Because of the sequence identity between homologous proteins in different species, specific binding can include an antibody that recognizes a protein in more than one species (e.g., human VEGF and mouse VEGF). Likewise, because of homology within certain regions of polypeptide sequences of different proteins, specific binding can include an antibody (or other polypeptide or binding agent) that recognizes more than one protein (e.g., human VEGF-A and human VEGF-B). It is understood that, in certain embodiments, an antibody or binding moiety that specifically binds a first target may or may not specifically bind a second target. As such, "specific binding" does not necessarily require (although it can include) exclusive binding, i.e. binding to a single target. Thus, an antibody may, in certain embodiments, specifically bind more than one target. In certain embodiments, multiple targets may be bound by the same antigen-binding site on the antibody. For example, an antibody may, in certain instances, comprise two identical antigen-binding sites, each of which specifically binds the same epitope on two or more

proteins. In certain alternative embodiments, an antibody may be multispecific and comprise at least two antigen-binding sites with differing specificities. By way of non-limiting example, a bispecific antibody may comprise one antigen-binding site that recognizes an epitope on one protein (e.g., human VEGF) and further comprise a second, different antigen-binding site that recognizes a different epitope on a second protein (e.g., human DLL4). Generally, but not necessarily, reference to binding means specific binding.

[0074] The terms "polypeptide" and "peptide" and "protein" are used interchangeably herein and refer to polymers of amino acids of any length. The polymer may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and it may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid polymer that has been modified naturally or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids), as well as other modifications known in the art. It is understood that, because the polypeptides of this invention may be based upon antibodies, in certain embodiments, the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

[0075] The terms "polynucleotide" and "nucleic acid" are used interchangeably herein and refer to polymers of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a polymer by DNA or RNA polymerase.

[0076] "Conditions of high stringency" may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 15mM sodium chloride/1.5mM sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 in 5x SSC (0.75M NaCl, 75mM sodium citrate) at 42°C; or (3) employ during hybridization 50% formamide in 5x SSC, 50mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2x SSC and 50% formamide, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1x SSC containing EDTA at 55°C.

[0077] The terms "identical" or percent "identity" in the context of two or more nucleic acids or polypeptides, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of nucleotides or amino acid residues that are the same, when compared and aligned (introducing gaps, if necessary) for maximum correspondence, not considering any conservative amino acid substitutions as part of the sequence identity. The percent identity may be measured using sequence comparison software or algorithms or by visual inspection. Various algorithms and software that may be used to obtain alignments of amino acid or nucleotide sequences are well-known in the art. These

include, but are not limited to, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, and variations thereof. In some embodiments, two nucleic acids or polypeptides of the invention are substantially identical, meaning they have at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, and in some embodiments at least 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nucleotide or amino acid residue identity, when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using a sequence comparison algorithm or by visual inspection. In some embodiments, identity exists over a region of the sequences that is at least about 10, at least about 20, at least about 40-60 residues, at least about 60-80 residues in length or any integral value therebetween. In some embodiments, identity exists over a longer region than 60-80 residues, such as at least about 80-100 residues, and in some embodiments the sequences are substantially identical over the full length of the sequences being compared, such as the coding region of a nucleotide sequence.

[0078] A "conservative amino acid substitution" is one in which one amino acid residue is replaced with another amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art, including basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). For example, substitution of a phenylalanine for a tyrosine is a conservative substitution. Preferably, conservative substitutions in the sequences of the polypeptides and antibodies of the invention do not abrogate the binding of the polypeptide or antibody containing the amino acid sequence, to the antigen to which the polypeptide or antibody binds. Methods of identifying nucleotide and amino acid conservative substitutions which do not eliminate antigen binding are well-known in the art.

[0079] The term "vector" as used herein means a construct, which is capable of delivering, and usually expressing, one or more gene(s) or sequence(s) of interest in a host cell. Examples of vectors include, but are not limited to, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, plasmid, cosmid, or phage vectors, DNA or RNA expression vectors associated with cationic condensing agents, and DNA or RNA expression vectors encapsulated in liposomes.

[0080] A polypeptide, antibody, polynucleotide, vector, cell, or composition which is "isolated" is a polypeptide, antibody, polynucleotide, vector, cell, or composition which is in a form not found in nature. Isolated polypeptides, antibodies, polynucleotides, vectors, cells, or compositions include those which have been purified to a degree that they are no longer in a form in which they are found in nature. In some embodiments, a polypeptide, antibody, polynucleotide, vector, cell, or composition which is isolated is substantially pure.

[0081] The term "substantially pure" as used herein refers to material which is at least 50% pure (i.e., free from contaminants), at least 90% pure, at least 95% pure, at least 98% pure, or at least 99% pure.

[0082] The terms "cancer" and "cancerous" as used herein refer to or describe the physiological condition in mammals in which a population of cells are characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, blastoma, sarcoma, and hematologic cancers such as lymphoma and leukemia.

[0083] The terms "tumor" and "neoplasm" as used herein refer to any mass of tissue that results from excessive cell growth or proliferation, either benign (noncancerous) or malignant (cancerous) including pre-cancerous lesions.

[0084] The term "metastasis" as used herein refers to the process by which a cancer spreads or transfers from the site of origin to other regions of the body with the development of a similar cancerous lesion at a new location. A "metastatic" or "metastasizing" cell is one that loses adhesive contacts with neighboring cells and migrates via the bloodstream or lymph from the primary site of disease to invade neighboring body structures.

[0085] The terms "cancer stem cell" and "CSC" and "tumor stem cell" and "tumor initiating cell" are used interchangeably herein and refer to cells from a cancer or tumor that: (1) have extensive proliferative capacity; 2) are capable of asymmetric cell division to generate one or more types of differentiated cell progeny wherein the differentiated cells have reduced proliferative or developmental potential; and (3) are capable of symmetric cell divisions for self-renewal or self-maintenance. These properties confer on the cancer stem cells the ability to form or establish a tumor or cancer upon serial transplantation into an immunocompromised host (e.g., a mouse) compared to the majority of tumor cells that fail to form tumors. Cancer stem cells undergo self-renewal versus differentiation in a chaotic manner to form tumors with abnormal cell types that can change over time as mutations occur.

[0086] The terms "cancer cell" and "tumor cell" refer to the total population of cells derived from a cancer or tumor or pre-cancerous lesion, including both non-tumorigenic cells, which comprise the bulk of the cancer cell population, and tumorigenic stem cells (cancer stem cells). As used herein, the terms "cancer cell" or "tumor cell" will be modified by the term "non-tumorigenic" when referring solely to those cells lacking the capacity to renew and differentiate to distinguish those tumor cells from cancer stem cells.

[0087] The term "tumorigenic" as used herein refers to the functional features of a cancer stem cell including the properties of self-renewal (giving rise to additional tumorigenic cancer stem cells) and proliferation to generate all other tumor cells (giving rise to differentiated and thus non-tumorigenic tumor cells).

[0088] The term "tumorigenicity" as used herein refers to the ability of a random sample of cells from the tumor to form palpable tumors upon serial transplantation into immunocompromised hosts (e.g., mice).

This definition also includes enriched and/or isolated populations of cancer stem cells that form palpable tumors upon serial transplantation into immunocompromised hosts (e.g., mice).

[0089] The term "subject" refers to any animal (e.g., a mammal), including, but not limited to, humans, non-human primates, canines, felines, rodents, and the like, which is to be the recipient of a particular treatment. Typically, the terms "subject" and "patient" are used interchangeably herein in reference to a human subject.

[0090] The term "pharmaceutically acceptable" refers to a product or compound approved (or approvable) by a regulatory agency of the Federal government or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans.

[0091] The terms "pharmaceutically acceptable excipient, carrier or adjuvant" or "acceptable pharmaceutical carrier" refer to an excipient, carrier or adjuvant that can be administered to a subject, together with at least one binding agent (e.g., an antibody) of the present disclosure, and which does not destroy the activity of the binding agent. The excipient, carrier or adjuvant should be nontoxic when administered with a binding agent in doses sufficient to deliver a therapeutic effect.

[0092] The terms "effective amount" or "therapeutically effective amount" or "therapeutic effect" refer to an amount of a binding agent, an antibody, polypeptide, polynucleotide, small organic molecule, or other drug effective to "treat" a disease or disorder in a subject or mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of a drug (e.g., an antibody) has a therapeutic effect and as such can reduce the number of cancer cells; decrease tumorigenicity, tumorigenic frequency or tumorigenic capacity; reduce the number or frequency of cancer stem cells; reduce the tumor size; reduce the cancer cell population; inhibit and/or stop cancer cell infiltration into peripheral organs including, for example, the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibit and/or stop tumor or cancer cell metastasis; inhibit and/or stop tumor or cancer cell growth; relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer; reduce morbidity and mortality; improve quality of life; or a combination of such effects. To the extent the agent, for example an antibody, prevents growth and/or kills existing cancer cells, it can be referred to as cytostatic and/or cytotoxic.

[0093] The terms "treating" or "treatment" or "to treat" or "alleviating" or "to alleviate" refer to both 1) therapeutic measures that cure, slow down, lessen symptoms of, and/or halt progression of a diagnosed pathologic condition or disorder and 2) prophylactic or preventative measures that prevent or slow the development of a targeted pathologic condition or disorder. Thus those in need of treatment include those already with the disorder; those prone to have the disorder; and those in whom the disorder is to be prevented. In some embodiments, a subject is successfully "treated" according to the methods of the present invention if the patient shows one or more of the following: a reduction in the number of or complete absence of cancer cells; a reduction in the tumor size; inhibition of or an absence of cancer cell infiltration into peripheral organs including the spread of cancer cells into soft tissue and bone; inhibition

of or an absence of tumor or cancer cell metastasis; inhibition or an absence of cancer growth; relief of one or more symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality; improvement in quality of life; reduction in tumorigenicity; reduction in the number or frequency of cancer stem cells; or some combination of effects.

[0094] As used in the present disclosure and claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural forms unless the context clearly dictates otherwise.

[0095] It is understood that wherever embodiments are described herein with the language "comprising" otherwise analogous embodiments described in terms of "consisting of" and/or "consisting essentially of" are also provided. It is also understood that wherever embodiments are described herein with the language "consisting essentially of" otherwise analogous embodiments described in terms of "consisting of" are also provided.

[0096] The term "and/or" as used in a phrase such as "A and/or B" herein is intended to include both A and B; A or B; A (alone); and B (alone). Likewise, the term "and/or" as used in a phrase such as "A, B, and/or C" is intended to encompass each of the following embodiments: A, B, and C; A, B, or C; A or C; A or B; B or C; A and C; A and B; B and C; A (alone); B (alone); and C (alone).

II. Antibodies

[0097] The present invention provides agents that specifically bind human VEGF proteins and/or human DLL4 proteins. These agents are referred to herein as "VEGF/DLL4-binding agents". The phrase "VEGF/DLL4-binding agent" encompasses agents that bind only VEGF, agents that bind only DLL4, and bispecific agents that bind both VEGF and DLL4. In certain embodiments, in addition to specifically binding VEGF and/or DLL4, the VEGF/DLL4-binding agents further specifically bind at least one additional target or antigen. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a polypeptide. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent specifically binds human VEGF. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent specifically binds human DLL4. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4. The full-length amino acid (aa) sequences for human VEGF (VEGF-A) and human DLL4 are known in the art and are provided herein as SEQ ID NO:27 (VEGF) and SEQ ID NO:23 (DLL4).

[0098] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a dissociation constant (K_D) of about 1μM or less, about 100nM or less, about 40nM or less, about 20nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a K_D of about 20nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or

DLL4 with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds VEGF and/or DLL4 with a K_D of about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds both human VEGF and mouse VEGF with a K_D of about 100nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds both human VEGF and mouse VEGF with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds both human DLL4 and mouse DLL4 with a K_D of about 100nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds both human DLL4 and mouse DLL4 with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, the dissociation constant of the binding agent (e.g., an antibody) to VEGF is the dissociation constant determined using a VEGF fusion protein comprising at least a portion of VEGF immobilized on a Biacore chip. In some embodiments, the dissociation constant of the binding agent (e.g., an antibody) to DLL4 is the dissociation constant determined using a DLL4-fusion protein comprising at least a portion of DLL4 immobilized on a Biacore chip.

[0099] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first antigen-binding site that specifically binds VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds DLL4. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 100nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 20nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody binds both VEGF and DLL4 with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, the affinity of one of the antigen-binding sites may be weaker than the affinity of the other antigen-binding site. For example, the K_D of one antigen binding site may be about 1nM and the K_D of the second antigen-binding site may be about 10nM. In some embodiments, the difference in affinity between the two antigen-binding sites may be about 2-fold or more, about 3-fold or more, about 5-fold or more, about 8-fold or more, about 10-fold or more, about 15-fold or more, about 20-fold or more, about 30-fold or more, about 50-fold or more, or about 100-fold or more. Modulation of the affinities of the two antigen-binding sites may affect the biological activity of the bispecific antibody. For example, decreasing the affinity of the antigen-binding site for DLL4 or VEGF, may have a desirable effect, for example decreased toxicity of the binding agent or increased therapeutic index.

[0100] By way of non-limiting example, the bispecific antibody may comprise (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1 nM and about 1.0 nM, and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM, between about 0.5nM and about 20nM, between about 1.0 nM and 10nM. In certain embodiments, the bispecific antibody comprises two identical light chains.

[0101] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds VEGF and/or DLL4 with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of about 1μM or less, about 100nM or less, about 40nM or less, about 20nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds VEGF and/or DLL4 with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of about 1μM or less, about 100nM or less, about 40nM or less, about 20nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less.

[0102] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody. In some embodiments, the antibody is a recombinant antibody. In some embodiments, the antibody is a monoclonal antibody. In some embodiments, the antibody is a chimeric antibody. In some embodiments, the antibody is a humanized antibody. In some embodiments, the antibody is a human antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgA, IgD, IgE, IgG, or IgM antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgG1 antibody. In certain embodiments, the antibody is an IgG2 antibody. In certain embodiments, the antibody is an antibody fragment comprising an antigen-binding site. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody. In some embodiments, the antibody is monovalent, monospecific, bivalent, or multispecific. In some embodiments, the antibody is conjugated to a cytotoxic moiety. In some embodiments, the antibody is isolated. In some embodiments, the antibody is substantially pure.

[0103] The VEGF/DLL4-binding agents (e.g., antibodies) of the present invention can be assayed for specific binding by any method known in the art. The immunoassays which can be used include, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as Biacore analysis, FACS analysis, immunofluorescence, immunocytochemistry, Western blot analysis, radioimmunoassay, ELISA, "sandwich" immunoassay, immunoprecipitation assay, precipitation reaction, gel diffusion precipitin reaction, immunodiffusion assay, agglutination assay, complement-fixation assay, immunoradiometric assay, fluorescent immunoassay, homogeneous time-resolved fluorescence assay (HTRF), and protein A immunoassay. Such assays are routine and well-known in the art (see, e.g., Ausubel et al., Editors, 1994-present, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY).

[0104] For example, the specific binding of an antibody to human VEGF and/or human DLL4 may be determined using ELISA. An ELISA assay comprises preparing antigen, coating wells of a 96 well microtiter plate with antigen, adding the antibody or other binding agent conjugated to a detectable compound such as an enzymatic substrate (e.g. horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) to the well, incubating for a period of time, and detecting the presence of the binding agent bound to the antigen. In some embodiments, the binding agent or antibody is not conjugated to a detectable compound, but instead a second antibody that recognizes the binding agent or antibody (e.g., an anti-Fc antibody) and is conjugated to a detectable compound is added to the well. In some embodiments, instead of coating the well with the antigen, the binding agent or antibody can be coated to the well and a second antibody

conjugated to a detectable compound can be added following the addition of the antigen to the coated well. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to increase the signal detected as well as other variations of ELISAs known in the art.

[0105] In another example, the specific binding of an antibody to human VEGF and/or human DLL4 may be determined using FACS. A FACS screening assay may comprise generating a cDNA construct that expresses an antigen as a fusion protein, transfecting the construct into cells, expressing the antigen on the surface of the cells, mixing the binding agent or antibody with the transfected cells, and incubating for a period of time. The cells bound by the binding agent or antibody may be identified by using a secondary antibody conjugated to a detectable compound (e.g., PE-conjugated anti-Fc antibody) and a flow cytometer. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to optimize the signal detected as well as other variations of FACS that may enhance screening (e.g., screening for blocking antibodies).

[0106] The binding affinity of an antibody or other binding-agent to an antigen (e.g., VEGF or DLL4) and the off-rate of an antibody-antigen interaction can be determined by competitive binding assays. One example of a competitive binding assay is a radioimmunoassay comprising the incubation of labeled antigen (e.g., ^{3}H or ^{125}I), or fragment or variant thereof, with the antibody of interest in the presence of increasing amounts of unlabeled antigen followed by the detection of the antibody bound to the labeled antigen. The affinity of the antibody for the antigen and the binding off-rates can be determined from the data by Scatchard plot analysis. In some embodiments, Biacore kinetic analysis is used to determine the binding on and off rates of antibodies or agents that bind an antigen (e.g., VEGF or DLL4). Biacore kinetic analysis comprises analyzing the binding and dissociation of antibodies from chips with immobilized antigen (e.g., VEGF or DLL4) on their surface.

[0107] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human VEGF, wherein the VEGF-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 219R45 (see Table 1). In some embodiments, the VEGF-binding agent comprises one or more of the CDRs of 219R45, two or more of the CDRs of 219R45, three or more of the CDRs of 219R45, four or more of the CDRs of 219R45, five or more of the CDRs of 219R45, or all six of the CDRs of 219R45. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds human VEGF and mouse VEGF.

Table 1

	219R45
HC CDR1	NYWMH (SEQ ID NO:17)
HC CDR2	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)

HC CDR3	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)
LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

[0108] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human VEGF, wherein the VEGF-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). In some embodiments, the VEGF-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0109] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human VEGF, wherein the VEGF-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0110] In certain embodiments, the invention provides a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds VEGF, wherein the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent

comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:11. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:49, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF-binding antibody or other agent comprises a heavy chain comprising SEQ IDNO:7, and a light chain comprising SEQ ID NO:8.

[0111] In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds VEGF with a K_D of about 0.01nM or less. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the VEGF-binding agent is substituted with a different amino acid so that the affinity of the VEGF-binding agent for VEGF is altered. In some embodiments, the affinity of the VEGF-binding agent is increased. In some embodiments, the affinity of the VEGF-binding agent is decreased. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF-binding agent binds human VEGF and mouse VEGF.

[0112] In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises the heavy chain variable region and light chain variable region of the 219R45 antibody. In certain embodiments, the VEGF-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 219R45 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, a VEGF-binding agent is the 219R45 antibody.

[0113] In certain embodiments, a VEGF-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 219R45.

[0114] In certain embodiments, a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as an antibody of the invention. In another embodiment, a VEGF-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a VEGF-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as antibody 219R45. In another

embodiment, the VEGF-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by antibody 219R45.

[0115] In some embodiments, the VEGF-binding agent inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor. In certain embodiments, the VEGF-binding agent inhibits binding of human VEGF to VEGFR-1 or VEGFR-2. In some embodiments, the VEGF-binding agent specifically binds VEGF and modulates angiogenesis. In some embodiments, the VEGF-binding agent specifically binds VEGF and inhibits angiogenesis. In some embodiments, the VEGF-binding agent specifically binds VEGF and inhibits tumor growth.

[0116] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 21R79 (see Table 2). In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises one or more of the CDRs of 21R79, two or more of the CDRs of 21R79, three or more of the CDRs of 21R79, four or more of the CDRs of 21R79, five or more of the CDRs of 21R79, or all six of the CDRs of 21R79. In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 21R75 (see Table 2). In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises one or more of the CDRs of 21R75, two or more of the CDRs of 21R75, three or more of the CDRs of 21R75, four or more of the CDRs of 21R75, five or more of the CDRs of 21R75, or all six of the CDRs of 21R75. In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent (e.g., an antibody) comprises one, two, three, four, five, and/or six of the CDRs of antibody 21R83 (see Table 2). In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises one or more of the CDRs of 21R83, two or more of the CDRs of 21R83, three or more of the CDRs of 21R83, four or more of the CDRs of 21R83, five or more of the CDRs of 21R83, or all six of the CDRs of 21R83. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds human DLL4 and mouse DLL4.

Table 2

	21R79	21R75	21R83
HC CDR1	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)
HC CDR2	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)
HC CDR3	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
LC CDR1	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)

LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

[0117] In certain embodiments, the heavy chain CDR1 of the DLL4-binding antibody is a minimal HC CDR1 comprising AYYIH (SEQ ID NO:79).

[0118] In some embodiments, the binding agent is an antibody that binds human DLL4 and comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0119] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the DLL4-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0120] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or

4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0121] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:10. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:48, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the DLL4-binding antibody or other agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:6, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody.

[0122] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the DLL4-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0123] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid

substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0124] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:58. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:58, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:58, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:56, and a light chain comprising SEQ ID NO:8.

[0125] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the DLL4-binding agent further comprises a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0126] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds human DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises: (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (b) a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (c) a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (d) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; (e) a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions; and (f) a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 amino acid substitutions. In certain embodiments, the amino acid substitutions are conservative substitutions.

[0127] In certain embodiments, the invention provides a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) that specifically binds DLL4, wherein the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:64. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:64, and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:64, and a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the DLL4-binding agent comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:62, and a light chain comprising SEQ ID NO:8.In some embodiments, the agent is a bispecific antibody.

[0128] In some embodiments, the DLL4-binding agent is an antibody that comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:5, and a light chain comprising SEQ ID NO:8. In some embodiments, the antibody is a bispecific antibody.

[0129] In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of 25nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of 10nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of about 1nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of about 0.1nM or less. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds DLL4 with a K_D of about 0.01nM or less. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the DLL4-binding agent is substituted with a different amino acid so that the affinity of the DLL4-binding agent for DLL4 is altered. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding agent is increased. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding agent is decreased.

[0130] In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain variable region and the light chain variable region of the 21R79 antibody. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 21R79 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, the DLL4-binding agent is the 21R79 antibody.

[0131] In certain embodiments, a DLL4-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 21R79.

[0132] In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain variable region and the light chain variable region of the 21R75 antibody. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 21R75 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, the DLL4-binding agent is the 21R75 antibody.

[0133] In certain embodiments, a DLL4-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 21R75.

[0134] In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain variable region and the light chain variable region of the 21R83 antibody. In certain embodiments, the DLL4-binding agent comprises the heavy chain and light chain of the 21R83 antibody (with or without the leader sequence). In certain embodiments, the DLL4-binding agent is the 21R83 antibody.

[0135] In certain embodiments, a DLL4-binding agent comprises, consists essentially of, or consists of, the antibody 21R83.

[0136] In some embodiments, a DLL4-binding agent binds an N-terminal fragment of human DLL4 (amino acids 1-191 of SEQ ID NO:24). In some embodiments, the DLL4-binding agent binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds an epitope comprising amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25. In some embodiments, the DLL4-binding agent binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25 and amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

[0137] In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as an antibody of the invention. In another embodiment, a DLL4-

binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R79. In another embodiment, the DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R79. In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R75. In another embodiment, the DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R75. In certain embodiments, a DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R83. In another embodiment, the DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R83.

[0138] In some embodiments, the DLL4-binding agent inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor. In certain embodiments, the Notch receptor is Notch1, Notch2, Notch3, or Notch4. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits DLL4 activity. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits Notch signaling. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and modulates angiogenesis. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits tumor growth. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and inhibits tumorigenicity. In some embodiments, the DLL4-binding agent specifically binds DLL4 and reduces the number or frequency of CSCs in a tumor.

[0139] In certain embodiments, the invention provides a VEGF/DLL4-binding agent that is a bispecific antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that binds a tumor-associated target. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR

(SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0140] In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11. In some embodiments, the bispecific antibody further comprises a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:11, and a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0141] In certain embodiments, the invention provides a VEGF/DLL4-binding agent that is a bispecific antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4 and a second antigen-binding site that binds a tumor-associated target. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy

chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site comprising a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). In some embodiments, the bispecific antibody further comprises: a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising: a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises (a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), and (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0142] In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent is a bispecific antibody comprising a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64. In some embodiments, the bispecific antibody further comprises a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and/or a light chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0143] In certain embodiments, the invention provides a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., a bispecific antibody) that specifically binds human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody comprises: a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising

$YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, a bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0144] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21R79.

[0145] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain

CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21M18.

[0146] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site which comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21R75.

[0147] In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody is 219R45-MB-21R83.

[0148] In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent (e.g., a bispecific antibody) comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:11; a second heavy chain variable region having at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and a first and a second light chain variable region having at least about 85%,

at least about 90%, at least about 95%, at least about 97%, or at least about 99% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region having at least about 95% sequence identity to SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain

variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12. In certain embodiments, the bispecific VEGF/DLL4-binding agent comprises a first heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

[0149] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21M18. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R79 and two identical light chain variable regions. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21M18 and two identical light chain variable regions. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R75 and two identical light chain variable regions. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain variable region from the anti-VEGF antibody 219R45, a heavy chain variable region from the anti-DLL4 antibody 21R83 and two identical light chain variable regions.

[0150] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers. In some embodiments, the first and second CH3 domains are modified using a knobs-into-holes technique. In some embodiments, the first and second CH3 domains comprise changes in amino acids that result in altered electrostatic interactions. In some embodiments, the first and second CH3 domains comprise changes in amino acids that result in altered hydrophobic/hydrophilic interactions.

[0151] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises heavy chain constant regions selected from the group consisting of: (a) a first human IgG1 constant region, wherein the amino acids at positions 253 and 292 are substituted with glutamate or aspartate, and a second human IgG1 constant region, wherein the amino acids at positions 240 and 282 are substituted

with lysine; (b) a first human IgG2 constant region, wherein the amino acids at positions 249 and 288 are substituted with glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region wherein the amino acids at positions 236 and 278 are substituted with lysine; (c) a first human IgG3 constant region, wherein the amino acids at positions 300 and 339 are substituted with glutamate or aspartate, and a second human IgG3 constant region wherein the amino acids at positions 287 and 329 are substituted with lysine; and (d) a first human IgG4 constant region, wherein the amino acids at positions 250 and 289 are substituted with glutamate or aspartate, and a second IgG4 constant region wherein the amino acids at positions 237 and 279 are substituted with lysine.

[0152] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG1 constant region with amino acid substitutions at positions 253 and 292, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG1 constant region with amino acid substitutions at positions 240 and 282, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG3 constant region with amino acid substitutions at positions 300 and 339, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 287 and 329, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG4 constant region with amino acid substitutions at positions 250 and 289, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG4 constant region with amino acid substitutions at positions 237 and 279, wherein the amino acids are lysine.

[0153] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are asparate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine.

[0154] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:5. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:56. In some

embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:62. In some embodiments, the bispecific antibody further comprises a light chain of SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:5, and two light chains of SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:6, and two light chains of SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:56, and two light chains of SEQ ID NO:8. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:62, and two light chains of SEQ ID NO:8.

[0155] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which binds VEGF with a K_D of about 50nM or less, about 25nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which binds DLL4 with a K_D of about 50nM or less, about 25nM or less, about 10nM or less, about 1nM or less, or about 0.1nM or less. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which binds VEGF with a K_D of about 50nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 50nM or less. In some embodiments, the bispecific antibody binds VEGF with a K_D of about 25nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 25nM or less. In some embodiments, the bispecific antibody binds VEGF with a K_D of about 10nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 10nM or less. In some embodiments, the bispecific antibody binds VEGF with a K_D of about 1nM or less and binds DLL4 with a K_D of about 1nM or less.

[0156] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody which comprises one antigen-binding site with a binding affinity that is weaker than the binding affinity of the second antigen-binding site. For example, in some embodiments, the bispecific antibody may bind VEGF with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nM and may bind DLL4 with a K_D ranging from about 1nM to 10nM. Or the bispecific antibody may bind VEGF with a K_D ranging from about 1nM to 10nM and may bind DLL4 with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nM. In some embodiments, the bispecific antibody may bind DLL4 with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nM and may bind VEGF with a K_D ranging from about 1nM to 10nM. Or the bispecific antibody may bind DLL4 with a K_D ranging from about 1nM to 10nM and may bind VEGF with a K_D ranging from about 0.1nM to 1nMIn some embodiments, the difference in affinity between the two antigen-binding sites may be about 2-fold or more, about 3-fold or more, about 5-fold or more, about 8-fold or more, about 10-fold or more, about 15-fold or more, about 30-fold or more, about 50-fold or more, or about 100-fold or more. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the antigen-binding site for VEGF is substituted with a different amino acid so that the affinity of the VEGF-binding site is altered. In some embodiments, the affinity of the

VEGF-binding site is increased. In some embodiments, the affinity of the VEGF-binding site is decreased. In some embodiments, at least one amino acid residue in at least one CDR of the antigen-binding site for DLL4 is substituted with a different amino acid so that the affinity of the DLL4-binding site is altered. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding site is increased. In some embodiments, the affinity of the DLL4-binding site is decreased. In some embodiments, the affinities of both the VEGF and DLL4 antigen-binding sites are altered.

[0157] The invention provides polypeptides, including but not limited to antibodies, that specifically bind VEGF and/or DLL4. In some embodiments, a polypeptide binds human VEGF. In some embodiments, a polypeptide binds human DLL4. In some embodiments, a polypeptide binds human VEGF and mouse VEGF. In some embodiments, a polypeptide binds human DLL4 and mouse DLL4.

[0158] In some embodiments, a VEGF-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:47, and SEQ ID NO:49.

[0159] In some embodiments, a DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ NO ID:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

[0160] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

[0161] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, and SEQ ID NO:49. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:12.

[0162] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, and SEQ ID NO:49. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2,

SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In some embodiments, the VEGF/DLL4 binding agent further comprises a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:12.

[0163] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) competes for specific binding to VEGF with an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 219R45 for specific binding to human VEGF. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody competes for specific binding to VEGF in an *in vitro* competitive binding assay. In some embodiments, the VEGF is human VEGF. In some embodiments, the VEGF is mouse VEGF.

[0164] In certain embodiments, a VEGF-DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as an antibody of the invention. In another embodiment, a VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on VEGF as antibody 219R45. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on VEGF that overlaps with the epitope on VEGF bound by antibody 219R45.

[0165] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF with the antibody 219R45 (e.g., in a competitive binding assay).

[0166] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) competes for specific binding to DLL4 with an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 21R79 for specific binding to human DLL4. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 21R75 for specific binding to human DLL4. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent competes with antibody 21R83 for specific binding to human DLL4. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent or antibody competes for specific binding to DLL4 in an *in vitro* competitive binding assay. In some embodiments, the DLL4 is human DLL4. In some embodiments, the DLL4 is mouse DLL4.

[0167] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as an antibody of the invention. In another embodiment, a VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by an antibody of the invention. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R79. In certain

embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent binds the same epitope, or essentially the same epitope, on DLL4 as antibody 21R83. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R79. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R75. In another embodiment, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds an epitope on DLL4 that overlaps with the epitope on DLL4 bound by antibody 21R83.

[0168] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21R79 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21R75 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21R83 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to DLL4 with the antibody 21M18 (e.g., in a competitive binding assay).

[0169] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M18 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M79 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M75 (e.g., in a competitive binding assay). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an agent that competes for specific binding to VEGF and/or DLL4 with the bispecific antibody 219R45-MB-21M83 (e.g., in a competitive binding assay).

[0170] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein binds VEGF and modulates VEGF activity. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and inhibits VEGF activity. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and modulates angiogenesis. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and inhibits angiogenesis. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a VEGF antagonist and inhibits tumor growth.

[0171] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein binds human DLL4 and modulates DLL4 activity. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits DLL4 activity. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits Notch activity. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits Notch signaling. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a

DLL4 antagonist and modulates angiogenesis. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and promotes aberrant angiogenesis. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is a DLL4 antagonist and inhibits tumor growth.

[0172] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein is a bispecific antibody that binds human VEGF and modulates VEGF activity. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein is a bispecific antibody that binds human DLL4 and modulates DLL4 activity. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) described herein is a bispecific antibody that binds human VEGF and human DLL4 and modulates both VEGF and DLL4 activity. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits both VEGF activity and DLL4 activity. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits VEGF activity and Notch activity. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits VEGF activity and Notch signaling. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and modulates angiogenesis. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and promotes aberrant angiogenesis. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits angiogenesis. In some embodiments, the bispecific antibody is a VEGF antagonist and a DLL4 antagonist and inhibits tumor growth.

[0173] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody or a bispecific antibody) is an antagonist of VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of VEGF and inhibits VEGF activity. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits VEGF activity by at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or about 100%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is antibody 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human VEGF activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0174] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) is an antagonist of DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of DLL4 and inhibits DLL4 activity. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits DLL4 activity by at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about

90%, or about 100%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is antibody 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is antibody 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits human DLL4 activity is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0175] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) is an antagonist of Notch signaling. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits Notch signaling by at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or about 100%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is antibody 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is antibody 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits Notch signaling is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0176] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) inhibits binding of VEGF to at least one receptor. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of VEGF to VEGFR-1 or VEGFR-2. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor by at least about 10%, at least about 25%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or at least about 95%. In certain embodiments, a

VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is antibody 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 219R45. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human VEGF to at least one VEGF receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0177] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) inhibits binding of DLL4 protein to at least one Notch receptor. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of DLL4 to Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor by at least about 10%, at least about 25%, at least about 50%, at least about 75%, at least about 90%, or at least about 95%. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is antibody 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is antibody 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is antibody 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is a bispecific antibody comprising the antigen-binding site of 21R83. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that inhibits binding of human DLL4 to at least one Notch receptor is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0178] *In vivo* and *in vitro* assays for determining whether a VEGF/DLL4-binding agent (or candidate VEGF/DLL4-binding agent) inhibits VEGF or affects angiogenesis are known in the art. *In vitro* assays of angiogenesis include but are not limited to, HUVEC proliferation assays, endothelial cell tube

formation assays, sprouting (or sprout formation) assays, HUVEC cell migration assays, and invasion assays. In some embodiments, cells in the presence of VEGF and the presence of a VEGF/DLL4-binding agent are compared to cells in the presence of VEGF without the VEGF/DLL4-binding agent present, and evaluated for effects on angiogenesis (or biological effects associated with angiogenesis). *In vivo* assays of angiogenesis include, but are not limited to, matrigel plug assays, corneal micropocket assays, and chicken chorioallantoic membrane (CAM) assays.

[0179] *In vivo* and *in vitro* assays for determining whether a VEGF/DLL4-binding agent (or candidate VEGF/DLL4-binding agent) inhibits Notch activation or signaling are known in the art. For example, cell-based, luciferase reporter assays utilizing a TCF/Luc reporter vector containing multiple copies of the TCF-binding domain upstream of a firefly luciferase reporter gene may be used to measure Notch signaling levels *in vitro* (Gazit et al., 1999, *Oncogene,* 18; 5959-66; TOPflash, Millipore, Billerica MA). In some embodiments, a cell-based, luciferase reporter assay utilizing a CBF/Luc reporter vector containing multiple copies of the CBF-binding domain upstream of a firefly luciferase report genes may be used. The level of Notch signaling in the presence of one or more Notch ligands (e.g., DLL4 expressed on the surface of transfected cells or soluble DLL4-Fc fusion protein) and in the presence of a VEGF/DLL4-binding agent is compared to the level of Notch signaling without the VEGF/DLL4-binding agent present.

[0180] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents have one or more of the following effects: inhibit proliferation of tumor cells, inhibit tumor growth, reduce the tumorigenicity of a tumor, reduce the frequency of cancer stem cells in a tumor, trigger cell death of tumor cells, prevent metastasis of tumor cells, decrease survival of tumor cells, modulate angiogenesis, inhibit angiogenesis, inhibit productive angiogenesis, or promote aberrant angiogenesis.

[0181] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting tumor growth. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting tumor growth *in vivo* (e.g., in a xenograft mouse model, and/or in a human having cancer). In certain embodiments, tumor growth is inhibited at least about two-fold, about three-fold, about five-fold, about ten-fold, about 50-fold, about 100-fold, or about 1000-fold as compared to an untreated tumor.

[0182] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of reducing the tumorigenicity of a tumor. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent or antibody is capable of reducing the tumorigenicity of a tumor comprising cancer stem cells in an animal model, such as a mouse xenograft model. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent or antibody is capable of reducing the tumorigenicity of a tumor by decreasing the number or frequency of cancer stem cells in the tumor. In certain embodiments, the number or frequency of cancer stem cells in a tumor is reduced by at least about two-fold, about three-fold, about five-fold, about ten-fold, about 50-fold, about 100-fold, or about 1000-fold. In certain embodiments, the reduction in the number or frequency of cancer stem cells is

determined by limiting dilution assay using an animal model. Additional examples and guidance regarding the use of limiting dilution assays to determine a reduction in the number or frequency of cancer stem cells in a tumor can be found, e.g., in International Publication Number WO 2008/042236; U.S. Patent Publication No. 2008/0064049; and U.S. Patent Publication No. 2008/0178305.

[0183] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of modulating angiogenesis. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are capable of modulating angiogenesis *in vivo* (e.g., in a xenograft mouse model, and/or in a human having cancer). In certain embodiments, VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting angiogenesis. In certain embodiments, VEGF/DLL4-binding agents are capable of promoting aberrant angiogenesis. In certain embodiments, VEGF/DLL4-binding agents are capable of inhibiting angiogenesis and/or promoting aberrant angiogenesis, leading to unproductive vascularization.

[0184] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents described herein have a circulating half-life in mice, cynomolgus monkeys, or humans of at least about 2 hours, at least about 5 hours, at least about 10 hours, at least about 24 hours, at least about 3 days, at least about 1 week, or at least about 2 weeks. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an IgG (e.g., IgG1 or IgG2) antibody that has a circulating half-life in mice, cynomolgus monkeys, or humans of at least about 2 hours, at least about 5 hours, at least about 10 hours, at least about 24 hours, at least about 3 days, at least about 1 week, or at least about 2 weeks. Methods of increasing (or decreasing) the half-life of agents such as polypeptides and antibodies are known in the art. For example, known methods of increasing the circulating half-life of IgG antibodies include the introduction of mutations in the Fc region which increase the pH-dependent binding of the antibody to the neonatal Fc receptor (FcRn) at pH 6.0 (see, e.g., U.S. Patent Publication Nos. 2005/0276799, 2007/0148164, and 2007/0122403). Known methods of increasing the circulating half-life of antibody fragments lacking the Fc region include such techniques as PEGylation.

[0185] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are antibodies. Polyclonal antibodies can be prepared by any known method. In some embodiments, polyclonal antibodies are produced by immunizing an animal (e.g., a rabbit, rat, mouse, goat, donkey) with an antigen of interest (e.g., a purified peptide fragment, full-length recombinant protein, or fusion protein) by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The antigen can be optionally conjugated to a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) or serum albumin. The antigen (with or without a carrier protein) is diluted in sterile saline and usually combined with an adjuvant (e.g., Complete or Incomplete Freund's Adjuvant) to form a stable emulsion. After a sufficient period of time, polyclonal antibodies are recovered from the immunized animal, usually from blood or ascites. The polyclonal antibodies can be purified from serum or ascites according to standard methods in the art including, but not limited to, affinity chromatography, ion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and dialysis.

[0186] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods known to one of skill in the art (see e.g., Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497). In some embodiments, using the hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is immunized as described above to elicit from lymphocytes the production of antibodies that specifically bind the immunizing antigen. In some embodiments, lymphocytes can be immunized *in vitro*. In some embodiments, the immunizing antigen can be a human protein or a portion thereof. In some embodiments, the immunizing antigen can be a mouse protein or a portion thereof.

[0187] Following immunization, lymphocytes are isolated and fused with a suitable myeloma cell line using, for example, polyethylene glycol. The hybridoma cells are selected using specialized media as known in the art and unfused lymphocytes and myeloma cells do not survive the selection process. Hybridomas that produce monoclonal antibodies directed specifically against a chosen antigen may be identified by a variety of methods including, but not limited to, immunoprecipitation, immunoblotting, and *in vitro* binding assays (e.g., flow cytometry, FACS, ELISA, and radioimmunoassay). The hybridomas can be propagated either in *in vitro* culture using standard methods (J.W. Goding, 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3^{rd} *Edition*, Academic Press, San Diego, CA) or *in vivo* as ascites tumors in an animal. The monoclonal antibodies can be purified from the culture medium or ascites fluid according to standard methods in the art including, but not limited to, affinity chromatography, ion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and dialysis.

[0188] In certain embodiments, monoclonal antibodies can be made using recombinant DNA techniques as known to one skilled in the art. The polynucleotides encoding a monoclonal antibody are isolated from mature B-cells or hybridoma cells, such as by RT-PCR using oligonucleotide primers that specifically amplify the genes encoding the heavy and light chains of the antibody, and their sequence is determined using standard techniques. The isolated polynucleotides encoding the heavy and light chains are then cloned into suitable expression vectors which produce the monoclonal antibodies when transfected into host cells such as E. coli, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin proteins.

[0189] In certain other embodiments, recombinant monoclonal antibodies, or fragments thereof, can be isolated from phage display libraries expressing variable domains or CDRs of a desired species (see e.g., McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; and Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581-597).

[0190] The polynucleotide(s) encoding a monoclonal antibody can be modified, for example, by using recombinant DNA technology to generate alternative antibodies. In some embodiments, the constant domains of the light and heavy chains of, for example, a mouse monoclonal antibody can be substituted for those regions of, for example, a human antibody to generate a chimeric antibody, or for a non-

immunoglobulin polypeptide to generate a fusion antibody. In some embodiments, the constant regions are truncated or removed to generate the desired antibody fragment of a monoclonal antibody. Site-directed or high-density mutagenesis of the variable region can be used to optimize specificity, affinity, etc. of a monoclonal antibody.

[0191] In some embodiments, a monoclonal antibody against VEGF and/or DLL4 is a humanized antibody. Typically, humanized antibodies are human immunoglobulins in which residues from the CDRs are replaced by residues from a CDR of a non-human species (e.g., mouse, rat, rabbit, hamster, etc.) that have the desired specificity, affinity, and/or binding capability using methods known to one skilled in the art. In some embodiments, the Fv framework region residues of a human immunoglobulin are replaced with the corresponding residues in an antibody from a non-human species that has the desired specificity, affinity, and/or binding capability. In some embodiments, a humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residues either in the Fv framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or capability. In general, a humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two or three, variable domain regions containing all, or substantially all, of the CDRs that correspond to the non-human immunoglobulin whereas all, or substantially all, of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. In some embodiments, a humanized antibody can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. In certain embodiments, such humanized antibodies are used therapeutically because they may reduce antigenicity and HAMA (human anti-mouse antibody) responses when administered to a human subject. One skilled in the art would be able to obtain a functional humanized antibody with reduced immunogenicity following known techniques (see e.g., U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; and 5,693,762).

[0192] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a human antibody. Human antibodies can be directly prepared using various techniques known in the art. In some embodiments, human antibodies may be generated from immortalized human B lymphocytes immunized *in vitro* or from lymphocytes isolated from an immunized individual. In either case, cells that produce an antibody directed against a target antigen can be generated and isolated (see, e.g., Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer et al., 1991, *J. Immunol.,* 147:86-95; and U.S. Patent Nos. 5,750,373; 5,567,610; and 5,229,275). In some embodiments, the human antibody can be selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS,* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.,* 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.,* 222:581). Alternatively, phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable domain gene repertoires from unimmunized donors. Techniques for the

generation and use of antibody phage libraries are also described in U.S. Patent Nos. 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; and 7,264,963; and Rothe et al., 2008, *J. Mol. Bio.,* 376:1182-1200. Once antibodies are identified, affinity maturation strategies known in the art, including but not limited to, chain shuffling (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783) and site-directed mutagenesis, may be employed to generate high affinity human antibodies.

[0193] In some embodiments, human antibodies can be made in transgenic mice that contain human immunoglobulin loci. Upon immunization these mice are capable of producing the full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. This approach is described in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016.

[0194] This invention also encompasses bispecific antibodies. Bispecific antibodies are capable of specifically recognizing and binding at least two different antigens or epitopes. The different epitopes can either be within the same molecule (e.g., two epitopes on a single protein) or on different molecules (e.g., one epitope on a protein and one epitope on a second protein). In some embodiments, a bispecific antibody has enhanced potency as compared to an individual antibody or to a combination of more than one antibody. In some embodiments, a bispecific antibody has reduced toxicity as compared to an individual antibody or to a combination of more than one antibody. It is known to those of skill in the art that any binding agent (e.g., antibody) may have unique pharmacokinetics (PK) (e.g., circulating half-life). In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to synchronize the PK of two active binding agents wherein the two individual binding agents have different PK profiles. In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to concentrate the actions of two binding agents (e.g., antibodies) in a common area (e.g., a tumor and/or tumor environment). In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to concentrate the actions of two binding agents (e.g., antibodies) to a common target (e.g., a tumor or a tumor cell). In some embodiments, a bispecific antibody has the ability to target the actions of two binding agents (e.g., antibodies) to more than one biological pathway or function.

[0195] In certain embodiments, the bispecific antibody specifically binds VEGF and a second target. In certain embodiments, the bispecific antibody specifically binds DLL4 and a second target. In certain embodiments, the bispecific antibody specifically binds VEGF and DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody specifically binds human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody is a monoclonal human or a humanized antibody. In some embodiments, the bispecific antibody inhibits angiogenesis and reduces cancer stem cell number or frequency. In some embodiments, the bispecific antibody inhibits blood vessel growth and inhibits blood vessel maturation. In some embodiments, the bispecific antibody prevents endothelial hyperproliferation. In some embodiments, the bispecific antibody has decreased toxicity and/or side effects. In some embodiments,

the bispecific antibody has decreased toxicity and/or side effects as compared to a mixture of the two individual antibodies or the antibodies as single agents. In some embodiments, the bispecific antibody has an increased therapeutic index. In some embodiments, the bispecific antibody has an increased therapeutic index as compared to a mixture of the two individual antibodies or the antibodies as single agents.

[0196] In some embodiments, the bispecific antibody can specifically recognize and bind a first antigen target, (e.g., DLL4) as well as a second antigen target, such as an effector molecule on a leukocyte (e.g., CD2, CD3, CD28, or B7) or a Fc receptor (e.g., CD64, CD32, or CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the first antigen target. In some embodiments, the bispecific antibodies can be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular target antigen. These antibodies possess an antigen-binding site (e.g., to human DLL4) and a second site which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA.

[0197] Techniques for making bispecific antibodies are known by those skilled in the art, see for example, Millstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; U.S. Patent No. 5,731,168; International Publication No. WO 2009/089004; and U.S. Patent Publication No. 2011/0123532. In some embodiments, the bispecific antibodies comprise heavy chain constant regions with modifications in the amino acids which are part of the interface between the two heavy chains. In some embodiments, the bispecific antibodies can be generated using a "knobs-into-holes" strategy (see. e.g., U.S. Patent No. 5,731,168; Ridgway et. al., 1996, *Prot. Engin.*, 9:617-621). At times the "knobs" and "holes" terminology is replaced with the terms "protuberances" and "cavities". In some embodiments, the bispecific antibodies may comprise variant hinge regions incapable of forming disulfide linkages between the heavy chains (see, e.g., WO 2006/028936). In some embodiments, the modifications may comprise changes in amino acids that result in altered electrostatic interactions. In some embodiments, the modifications may comprise changes in amino acids that result in altered hydrophobic/hydrophilic interactions.

[0198] Bispecific antibodies can be intact antibodies or antibody fragments comprising antigen-binding sites. Antibodies with more than two valencies are also contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared (Tutt et al., 1991, *J. Immunol.*, 147:60). Thus, in certain embodiments the antibodies to VEGF and/or DLL4 are multispecific.

[0199] In certain embodiments, the antibodies (or other polypeptides) described herein may be monospecific. In certain embodiments, each of the one or more antigen-binding sites that an antibody contains is capable of binding (or binds) a homologous epitope on different proteins.

[0200] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody fragment. Antibody fragments may have different functions or capabilities than intact antibodies; for example, antibody fragments can have increased tumor penetration. Various techniques are known for the production of antibody fragments including, but not limited to, proteolytic digestion of intact antibodies. In some embodiments, antibody fragments include a F(ab')2 fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule. In some embodiments, antibody fragments include a Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an F(ab')2 fragment. In other embodiments, antibody fragments include a Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent. In certain embodiments, antibody fragments are produced recombinantly. In some embodiments, antibody fragments include Fv or single chain Fv (scFv) fragments. Fab, Fv, and scFv antibody fragments can be expressed in and secreted from E. coli or other host cells, allowing for the production of large amounts of these fragments. In some embodiments, antibody fragments are isolated from antibody phage libraries as discussed herein. For example, methods can be used for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., 1989, *Science*, 246:1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for VEGF and/or DLL4 or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. In some embodiments, antibody fragments are linear antibody fragments. In certain embodiments, antibody fragments are monospecific or bispecific. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a scFv. Various techniques can be used for the production of single-chain antibodies specific to VEGF or DLL4 (see, e.g., U.S. Patent No. 4,946,778).

[0201] It can further be desirable, especially in the case of antibody fragments, to modify an antibody in order to alter (e.g., increase or decrease) its serum half-life. This can be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle (e.g., by DNA or peptide synthesis).

[0202] Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune cells to unwanted cells (see, e.g., U.S. Patent No. 4,676,980). It is also contemplated that the heteroconjugate antibodies can be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

[0203] For the purposes of the present invention, it should be appreciated that modified antibodies can comprise any type of variable region that provides for the association of the antibody with the target (i.e., human VEGF or human DLL4). In this regard, the variable region may comprise or be derived from any type of mammal that can be induced to mount a humoral response and generate immunoglobulins against

the desired antigen. As such, the variable region of the modified antibodies can be, for example, of human, murine, non-human primate (e.g. cynomolgus monkeys, macaques, etc.) or rabbit origin. In some embodiments, both the variable and constant regions of the modified immunoglobulins are human. In other embodiments, the variable regions of compatible antibodies (usually derived from a non-human source) can be engineered or specifically tailored to improve the binding properties or reduce the immunogenicity of the molecule. In this respect, variable regions useful in the present invention can be humanized or otherwise altered through the inclusion of imported amino acid sequences.

[0204] In certain embodiments, the variable domains in both the heavy and light chains are altered by at least partial replacement of one or more CDRs and, if necessary, by partial framework region replacement and sequence modification and/or alteration. Although the CDRs may be derived from an antibody of the same class or even subclass as the antibody from which the framework regions are derived, it is envisaged that the CDRs may be derived from an antibody of different class and often from an antibody from a different species. It may not be necessary to replace all of the CDRs with all of the CDRs from the donor variable region to transfer the antigen binding capacity of one variable domain to another. Rather, it may only be necessary to transfer those residues that are required to maintain the activity of the antigen-binding site.

[0205] Alterations to the variable region notwithstanding, those skilled in the art will appreciate that the modified antibodies of this invention will comprise antibodies (e.g., full-length antibodies or immunoreactive fragments thereof) in which at least a fraction of one or more of the constant region domains has been deleted or otherwise altered so as to provide desired biochemical characteristics such as increased tumor localization or increased serum half-life when compared with an antibody of approximately the same immunogenicity comprising a native or unaltered constant region. In some embodiments, the constant region of the modified antibodies will comprise a human constant region. Modifications to the constant region compatible with this invention comprise additions, deletions or substitutions of one or more amino acids in one or more domains. The modified antibodies disclosed herein may comprise alterations or modifications to one or more of the three heavy chain constant domains (CH1, CH2 or CH3) and/or to the light chain constant domain (CL). In some embodiments, one or more domains are partially or entirely deleted from the constant regions of the modified antibodies. In some embodiments, the modified antibodies will comprise domain deleted constructs or variants wherein the entire CH2 domain has been removed (ΔCH2 constructs). In some embodiments, the omitted constant region domain is replaced by a short amino acid spacer (e.g., 10 amino acid residues) that provides some of the molecular flexibility typically imparted by the absent constant region.

[0206] In some embodiments, the modified antibodies are engineered to fuse the CH3 domain directly to the hinge region of the antibody. In other embodiments, a peptide spacer is inserted between the hinge region and the modified CH2 and/or CH3 domains. For example, constructs may be expressed wherein

the CH2 domain has been deleted and the remaining CH3 domain (modified or unmodified) is joined to the hinge region with a 5-20 amino acid spacer. Such a spacer may be added to ensure that the regulatory elements of the constant domain remain free and accessible or that the hinge region remains flexible. However, it should be noted that amino acid spacers may, in some cases, prove to be immunogenic and elicit an unwanted immune response against the construct. Accordingly, in certain embodiments, any spacer added to the construct will be relatively non-immunogenic so as to maintain the desired biological qualities of the modified antibodies.

[0207] In some embodiments, the modified antibodies may have only a partial deletion of a constant domain or substitution of a few or even a single amino acid. For example, the mutation of a single amino acid in selected areas of the CH2 domain may be enough to substantially reduce Fc binding and thereby increase cancer cell localization and/or tumor penetration. Similarly, it may be desirable to simply delete the part of one or more constant region domains that control a specific effector function (e.g. complement C1q binding) to be modulated. Such partial deletions of the constant regions may improve selected characteristics of the antibody (serum half-life) while leaving other desirable functions associated with the subject constant region domain intact. Moreover, as alluded to above, the constant regions of the disclosed antibodies may be modified through the mutation or substitution of one or more amino acids that enhances the profile of the resulting construct. In this respect it may be possible to disrupt the activity provided by a conserved binding site (e.g., Fc binding) while substantially maintaining the configuration and immunogenic profile of the modified antibody. In certain embodiments, the modified antibodies comprise the addition of one or more amino acids to the constant region to enhance desirable characteristics such as decreasing or increasing effector function or provide for more cytotoxin or carbohydrate attachment sites.

[0208] It is known in the art that the constant region mediates several effector functions. For example, binding of the C1 component of complement to the Fc region of IgG or IgM antibodies (bound to antigen) activates the complement system. Activation of complement is important in the opsonization and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and can also be involved in autoimmune hypersensitivity. In addition, the Fc region of an antibody can bind a cell expressing a Fc receptor (FcR). There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including IgG (gamma receptors), IgE (epsilon receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell cytotoxicity or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer, and control of immunoglobulin production.

[0209] In certain embodiments, the modified antibodies provide for altered effector functions that, in turn, affect the biological profile of the administered antibody. For example, in some embodiments, the deletion or inactivation (through point mutations or other means) of a constant region domain may reduce Fc receptor binding of the circulating modified antibody thereby increasing cancer cell localization and/or tumor penetration. In other embodiments, the constant region modifications increase the serum half-life of the antibody. In other embodiments, the constant region modifications reduce the serum half-life of the antibody. In some embodiments, the constant region is modified to eliminate disulfide linkages or oligosaccharide moieties. Modifications to the constant region in accordance with this invention may easily be made using well known biochemical or molecular engineering techniques known to those of skill in the art.

[0210] In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent that is an antibody does not have one or more effector functions. For instance, in some embodiments, the antibody has no ADCC activity, and/or no complement-dependent cytotoxicity (CDC) activity. In certain embodiments, the antibody does not bind an Fc receptor, and/or complement factors. In certain embodiments, the antibody has no effector function.

[0211] The present invention further embraces variants and equivalents which are substantially homologous to the chimeric, humanized, and human antibodies, or antibody fragments thereof, set forth herein. These can contain, for example, conservative substitution mutations, i.e. the substitution of one or more amino acids by similar amino acids. For example, conservative substitution refers to the substitution of an amino acid with another amino acid within the same general class such as, for example, one acidic amino acid with another acidic amino acid, one basic amino acid with another basic amino acid or one neutral amino acid by another neutral amino acid. What is intended by a conservative amino acid substitution is well known in the art and described herein.

[0212] Thus, the present invention provides methods for producing an antibody that binds VEGF and/or DLL4, including bispecific antibodies that specifically bind both VEGF and DLL4. In some embodiments, the method for producing an antibody that binds VEGF and/or DLL4 comprises using hybridoma techniques. In some embodiments, the method of generating an antibody that binds VEGF or DLL4 or a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4 comprises screening a human phage library. The present invention further provides methods of identifying an antibody that binds VEGF and/or DLL4. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for binding to VEGF or a portion thereof. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for binding to DLL4 or a portion thereof. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for binding to both VEGF and DLL4 or a portion thereof. In some embodiments, the antibody is identified by screening using ELISA for binding to VEGF. In some embodiments, the antibody is identified by screening using ELISA for binding to DLL4. In some embodiments, the antibody is identified by screening using ELISA

for binding to VEGF and DLL4. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for blocking of binding of human VEGF to a human VEGF receptor. In some embodiments, the antibody is identified by FACS screening for blocking of binding of human DLL4 to a human Notch receptor. In some embodiments, the antibody is identified by screening for inhibition or blocking of Notch signaling. In some embodiments, the antibody is identified by screening for inhibition or blocking of VEGF activity (e.g., induction of HUVEC proliferation). In some embodiments, the antibody is identified by screening for modulation of angiogenesis.

[0213] In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising amino acids 27-232 of human VEGF. In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF. In some embodiments, the method further comprises isolating antibodies or antibody-producing cells from the mammal. In some embodiments, a method of generating a monoclonal antibody which binds VEGF comprises: immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF, and isolating antibody-producing cells from the immunized mammal. In some embodiments, the method further comprises fusing the antibody-producing cells with cells of a myeloma cell line to form hybridoma cells. In some embodiments, the method further comprises selecting a hybridoma cell expressing an antibody that binds VEGF. In certain embodiments, the mammal is a mouse. In some embodiments, the antibody is selected using a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF.

[0214] In some embodiments, a method of generating an antibody to human DLL4 comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising amino acids 27-529 of human DLL4. In some embodiments, a method of generating an antibody to human DLL4 comprises immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4. In some embodiments, a method of generating a monoclonal antibody which binds DLL4 comprises: immunizing a mammal with a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4, and isolating antibody producing cells from the immunized mammal. In some embodiments, the method further comprises fusing the antibody-producing cells with cells of a myeloma cell line to form hybridoma cells. In some embodiments, the method further comprises selecting a hybridoma cell expressing an antibody that binds DLL4. In certain embodiments, the mammal is a mouse. In some embodiments, the antibody is selected using a polypeptide comprising at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4.

[0215] In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF comprises screening an antibody-expressing library for antibodies that bind human VEGF. In some embodiments, a method of generating an antibody human DLL4 comprises screening an antibody-expressing library for antibodies

that bind human DLL4. In some embodiments, a method of generating an antibody to human VEGF and/or human DLL4 comprises screening an antibody-expressing library for bispecific antibodies that bind human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the antibody-expressing library is a phage library. In some embodiments, the screening comprises panning. In some embodiments, the antibody-expressing library (e.g., a phage library) is screened using at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF. In some embodiments, antibodies identified in the first screening, are screened again using at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4 to identify a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4. In some embodiments, the antibody-expressing library (e.g., a phage library) is screened using at least a portion of amino acids 27-529 of human DLL4. In some embodiments, antibodies identified in the first screening, are screened again using at least a portion of amino acids 27-232 of human VEGF to identify a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4. In some embodiments, the antibody identified in the screening is a VEGF antagonist. In some embodiments, the antibody identified in the screening inhibits biological activities induced by VEGF. In some embodiments, the antibody identified in the screening is a DLL4 antagonist. In some embodiments, the antibody identified in the screening inhibits Notch signaling induced by DLL4. In some embodiments, the antibody identified in the screening binds both human VEGF and mouse VEGF. In some embodiments, the antibody identified in the screening binds both human DLL4 and mouse DLL4.

[0216] In certain embodiments, the antibodies described herein are isolated. In certain embodiments, the antibodies described herein are substantially pure.

[0217] In some embodiments of the present invention, the VEGF/DLL4-binding agents are polypeptides. The polypeptides can be recombinant polypeptides, natural polypeptides, or synthetic polypeptides comprising an antibody, or fragment thereof, that bind VEGF and/or DLL4. It will be recognized in the art that some amino acid sequences of the binding agents described herein can be varied without significant effect on the structure or function of the protein. Thus, the invention further includes variations of the polypeptides which show substantial activity or which include regions of an antibody, or fragment thereof, against human VEGF and/or DLL4. In some embodiments, amino acid sequence variations of VEGF/DLL4-binding polypeptides include deletions, insertions, inversions, repeats, and/or other types of substitutions.

[0218] In some embodiments, the polypeptides described herein are isolated. In some embodiments, the polypeptides described herein are substantially pure.

[0219] The polypeptides, analogs and variants thereof, can be further modified to contain additional chemical moieties not normally part of the polypeptide. The derivatized moieties can improve or otherwise modulate the solubility, the biological half-life, and/or absorption of the polypeptide. The moieties can also reduce or eliminate undesirable side effects of the polypeptides and variants. An

overview for chemical moieties can be found in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *21st Edition*, 2005, University of the Sciences, Philadelphia, PA.

[0220] The polypeptides described herein can be produced by any suitable method known in the art. Such methods range from direct protein synthesis methods to constructing a DNA sequence encoding polypeptide sequences and expressing those sequences in a suitable host. In some embodiments, a DNA sequence is constructed using recombinant technology by isolating or synthesizing a DNA sequence encoding a wild-type protein of interest. Optionally, the sequence can be mutagenized by site-specific mutagenesis to provide functional analogs thereof. See, e.g., Zoeller et al., 1984, *PNAS,* 81:5662-5066 and U.S. Patent No. 4,588,585.

[0221] In some embodiments, a DNA sequence encoding a polypeptide of interest may be constructed by chemical synthesis using an oligonucleotide synthesizer. Oligonucleotides can be designed based on the amino acid sequence of the desired polypeptide and selecting those codons that are favored in the host cell in which the recombinant polypeptide of interest will be produced. Standard methods can be applied to synthesize a polynucleotide sequence encoding an isolated polypeptide of interest. For example, a complete amino acid sequence can be used to construct a back-translated gene. Further, a DNA oligomer containing a nucleotide sequence coding for the particular isolated polypeptide can be synthesized. For example, several small oligonucleotides coding for portions of the desired polypeptide can be synthesized and then ligated. The individual oligonucleotides typically contain 5' or 3' overhangs for complementary assembly.

[0222] Once assembled (by synthesis, site-directed mutagenesis, or another method), the polynucleotide sequences encoding a particular polypeptide of interest can be inserted into an expression vector and operatively linked to an expression control sequence appropriate for expression of the protein in a desired host. Proper assembly can be confirmed by nucleotide sequencing, restriction enzyme mapping, and/or expression of a biologically active polypeptide in a suitable host. As is well-known in the art, in order to obtain high expression levels of a transfected gene in a host, the gene must be operatively linked to transcriptional and translational expression control sequences that are functional in the chosen expression host.

[0223] In certain embodiments, recombinant expression vectors are used to amplify and express DNA encoding antibodies, or fragments thereof, against human VEGF and/or DLL4. For example, recombinant expression vectors can be replicable DNA constructs which have synthetic or cDNA-derived DNA fragments encoding a polypeptide chain of a VEGF/DLL4-binding agent, such as an anti-VEGF antibody or an anti-DLL4 antibody, or fragment thereof, operatively linked to suitable transcriptional and/or translational regulatory elements derived from mammalian, microbial, viral, or insect genes. A transcriptional unit generally comprises an assembly of (1) a genetic element or elements having a regulatory role in gene expression, for example, transcriptional promoters or enhancers, (2) a structural or

coding sequence which is transcribed into mRNA and translated into protein, and (3) appropriate transcription and translation initiation and termination sequences. Regulatory elements can include an operator sequence to control transcription. The ability to replicate in a host, usually conferred by an origin of replication, and a selection gene to facilitate recognition of transformants can additionally be incorporated. DNA regions are "operatively linked" when they are functionally related to each other. For example, DNA for a signal peptide (secretory leader) is operatively linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a precursor which participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operatively linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operatively linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. In some embodiments, structural elements intended for use in yeast expression systems include a leader sequence enabling extracellular secretion of translated protein by a host cell. In other embodiments, in situations where recombinant protein is expressed without a leader or transport sequence, it can include an N-terminal methionine residue. This residue can optionally be subsequently cleaved from the expressed recombinant protein to provide a final product.

[0224] The choice of an expression control sequence and an expression vector depends upon the choice of host. A wide variety of expression host/vector combinations can be employed. Useful expression vectors for eukaryotic hosts include, for example, vectors comprising expression control sequences from SV40, bovine papilloma virus, adenovirus, and cytomegalovirus. Useful expression vectors for bacterial hosts include known bacterial plasmids, such as plasmids from E. coli, including pCR1, pBR322, pMB9, and their derivatives, and wider host range plasmids, such as M13 and other filamentous single-stranded DNA phages.

[0225] The VEGF/DLL4-binding agents (e.g., polypeptides) of the present invention can be expressed from one or more vectors. For example, in some embodiments, one heavy chain polypeptide is expressed by one vector, a second heavy chain polypeptide is expressed by a second vector and a light chain polypeptide is expressed by a third vector. In some embodiments, a first heavy chain polypeptide and a light chain polypeptide is expressed by one vector and a second heavy chain polypeptide is expressed by a second vector. In some embodiments, two heavy chain polypeptides are expressed by one vector and a light chain polypeptide is expressed by a second vector. In some embodiments, three polypeptides are expressed from one vector. Thus, in some embodiments, a first heavy chain polypeptide, a second heavy chain polypeptide, and a light chain polypeptide are expressed by a single vector.

[0226] Suitable host cells for expression of a VEGF/DLL4-binding polypeptide or antibody (or a VEGF or DLL4 protein to use as an antigen) include prokaryotes, yeast cells, insect cells, or higher eukaryotic cells under the control of appropriate promoters. Prokaryotes include gram-negative or gram-positive organisms, for example E. coli or Bacillus. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described below. Cell-free translation systems may also be employed. Appropriate

cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described in Pouwels et al., 1985, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, NY. Additional information regarding methods of protein production, including antibody production, can be found, e.g., in U.S. Patent Publication No. 2008/0187954; U.S. Patent Nos. 6,413,746; 6,660,501; and International Patent Publication No. WO 04/009823.

[0227] Various mammalian or insect cell culture systems may be used to express recombinant polypeptides. Expression of recombinant proteins in mammalian cells may be desirable because these proteins are generally correctly folded, appropriately modified, and biologically functional. Examples of suitable mammalian host cell lines include, but are not limited to, COS-7 (monkey kidney-derived), L-929 (murine fibroblast-derived), C127 (murine mammary tumor-derived), 3T3 (murine fibroblast-derived), CHO (Chinese hamster ovary-derived), HeLa (human cervical cancer-derived), BHK (hamster kidney fibroblast-derived), HEK-293 (human embryonic kidney-derived) cell lines and variants of these cell lines. Mammalian expression vectors can comprise non-transcribed elements such as an origin of replication, a suitable promoter and enhancer linked to the gene to be expressed, and other 5' or 3' flanking non-transcribed sequences, and 5' or 3' non-translated sequences, such as necessary ribosome binding sites, a polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, and transcriptional termination sequences. Expression of recombinant proteins in baculovirus also offers a robust method for producing correctly folded and biologically functional proteins. Baculovirus systems for production of heterologous proteins in insect cells are well-known to those of skill in the art (see, e.g., Luckow and Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

[0228] Thus, the present invention provides cells comprising the VEGF/DLL4-binding agents described herein. In some embodiments, the cells produce the VEGF/DLL4-binding agents described herein. In certain embodiments, the cells produce an antibody. In some embodiments, the cells produce a VEGF-binding agent, such as an anti-VEGF antibody. In some embodiments, the cells produce a bispecific antibody that binds VEGF. In some embodiments, the cells produce a DLL4-binding agent, such as an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the cells produce a bispecific antibody that binds DLL4. In certain embodiments, the cells produce a bispecific VEGF/DLL4-binding agent, such as a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4. In certain embodiments, the cells produce antibody 219R45. In certain embodiments, the cells produce antibody 21R79. In certain embodiments, the cells produce antibody 21R75. In certain embodiments, the cells produce antibody 21R83. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 21R79. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 21R75. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 21R83. In certain embodiments, the

cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21R79. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21M18. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21R75. In certain embodiments, the cells produce a bispecific antibody which comprises an antigen-binding site from antibody 219R45 and an antigen-binding site from antibody 21R83. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In certain embodiments, the cells produce the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0229] The proteins produced by a transformed host can be purified according to any suitable method. Standard methods include chromatography (e.g., ion exchange, affinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for protein purification. Affinity tags such as hexa-histidine, maltose binding domain, influenza coat sequence, and glutathione-S-transferase can be attached to the protein to allow easy purification by passage over an appropriate affinity column. Affinity chromatography used for purifying immunoglobulins can include Protein A, Protein G, and Protein L chromatography. Isolated proteins can be physically characterized using such techniques as proteolysis, size exclusion chromatography (SEC), mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR), isoelectric focusing (IEF), high performance liquid chromatography (HPLC), and x-ray crystallography. The purity of isolated proteins can be determined using techniques known to those of skill in the art, including but not limited to, SDS-PAGE, SEC, capillary gel electrophoresis, IEF, and capillary isoelectric focusing (cIEF).

[0230] In some embodiments, supernatants from expression systems which secrete recombinant protein into culture media can be first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Following the concentration step, the concentrate can be applied to a suitable purification matrix. In some embodiments, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose, or other types commonly employed in protein purification. In some embodiments, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. In some embodiments, a hydroxyapatite media can be employed, including but not limited to, ceramic hydroxyapatite (CHT). In certain embodiments, one or more reverse-phase HPLC steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify a recombinant protein (e.g., a VEGF/DLL4-binding agent). Some or all of the

foregoing purification steps, in various combinations, can be employed to provide a homogeneous recombinant protein.

[0231] In some embodiments, heterodimeric proteins such as bispecific antibodies are purified according the any of the methods described herein. In some embodiments, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies are isolated and/or purified using at least one chromatography step. In some embodiments, the at least one chromatography step comprises affinity chromatography. In some embodiments, the at least one chromatography step further comprises anion exchange chromatography. In some embodiments, the isolated and/or purified antibody product comprises at least 90% heterodimeric antibody. In some embodiments, the isolated and/or purified antibody product comprises at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% heterodimeric antibody. In some embodiments, the isolated and/or purified antibody product comprises about 100% heterodimeric antibody.

[0232] In some embodiments, recombinant protein produced in bacterial culture can be isolated, for example, by initial extraction from cell pellets, followed by one or more concentration, salting-out, aqueous ion exchange, or size exclusion chromatography steps. HPLC can be employed for final purification steps. Microbial cells employed in expression of a recombinant protein can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

[0233] Methods known in the art for purifying antibodies and other proteins also include, for example, those described in U.S. Patent Publication Nos. 2008/0312425; 2008/0177048; and 2009/0187005.

[0234] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a polypeptide that is not an antibody. A variety of methods for identifying and producing non-antibody polypeptides that bind with high affinity to a protein target are known in the art. See, e.g., Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.,* 18:295-304; Hosse et al., 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill et al., 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.,* 275:2668-76; and Skerra, 2008, *FEBS J.,* 275:2677-83. In certain embodiments, phage or mammalian cell display technology may be used to produce and/or identify a VEGF/DLL4-binding polypeptide that is not an antibody. In certain embodiments, the polypeptide comprises a protein scaffold of a type selected from the group consisting of protein A, protein G, a lipocalin, a fibronectin domain, an ankyrin consensus repeat domain, and thioredoxin.

[0235] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents or antibodies can be used in any one of a number of conjugated (i.e. an immunoconjugate or radioconjugate) or non-conjugated forms. In certain embodiments, the antibodies can be used in a non-conjugated form to harness the subject's natural defense mechanisms including complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cellular toxicity to eliminate malignant or cancer cells.

[0236] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody or polypeptide) is conjugated to a cytotoxic agent. In some embodiments, the cytotoxic agent is a chemotherapeutic agent

including, but not limited to, methotrexate, adriamicin, doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents. In some embodiments, the cytotoxic agent is an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof, including, but not limited to, diphtheria A chain, non-binding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), Momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, Sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. In some embodiments, the cytotoxic agent is a radioisotope to produce a radioconjugate or a radioconjugated antibody. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies including, but not limited to, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re and ^{212}Bi. Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as calicheamicins, maytansinoids, trichothecenes, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, can also be used. Conjugates of an antibody and cytotoxic agent can be made using a variety of bifunctional protein-coupling agents including, but not limited to, N-succinimidyl-3-(2-pyridyidithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene).

III. Polynucleotides

[0237] In certain embodiments, the invention encompasses polynucleotides comprising polynucleotides that encode a polypeptide (or a fragment of a polypeptide) that specifically binds VEGF, DLL4, both VEGF and DLL4. The term "polynucleotides that encode a polypeptide" encompasses a polynucleotide which includes only coding sequences for the polypeptide, as well as a polynucleotide which includes additional coding and/or non-coding sequences. For example, in some embodiments, the invention provides a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes an antibody to human VEGF or encodes a fragment of such an antibody (e.g., a fragment comprising the antigen-binding site). In some embodiments, the invention provides a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes an antibody to human DLL4 or encodes a fragment of such an antibody (e.g., a fragment comprising the antigen-binding site). The polynucleotides of the invention can be in the form of RNA or in the form of DNA. DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA; and can be double-stranded or single-stranded, and if single-stranded can be the coding strand or non-coding (anti-sense) strand.

[0238] In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64. In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, and SEQ ID NO: 64. In some embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78.

[0239] In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide having a nucleotide sequence at least about 80% identical, at least about 85% identical, at least about 90% identical, at least about 95% identical, and in some embodiments, at least about 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78. In certain embodiments, the polynucleotide comprises a polynucleotide having a nucleotide sequence at least about 80% identical, at least about 85% identical, at least about 90% identical, at least about 95% identical, and in some embodiments, at least about 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78. Also provided is a polynucleotide that comprises a polynucleotide that hybridizes to SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID

NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78. In certain embodiments, the hybridization is under conditions of high stringency.

[0240] In certain embodiments, the polynucleotides comprise the coding sequence for the mature polypeptide fused in the same reading frame to a polynucleotide which aids, for example, in expression and secretion of a polypeptide from a host cell (e.g., a leader sequence which functions as a secretory sequence for controlling transport of a polypeptide from the cell). The polypeptide having a leader sequence is a preprotein and can have the leader sequence cleaved by the host cell to form the mature form of the polypeptide. The polynucleotides can also encode for a proprotein which is the mature protein plus additional 5' amino acid residues. A mature protein having a prosequence is a proprotein and is an inactive form of the protein. Once the prosequence is cleaved an active mature protein remains.

[0241] In certain embodiments, the polynucleotides comprise the coding sequence for the mature polypeptide fused in the same reading frame to a marker sequence that allows, for example, for purification of the encoded polypeptide. For example, the marker sequence can be a hexa-histidine tag supplied by a pQE-9 vector to provide for purification of the mature polypeptide fused to the marker in the case of a bacterial host, or the marker sequence can be a hemagglutinin (HA) tag derived from the influenza hemagglutinin protein when a mammalian host (e.g., COS-7 cells) is used. In some embodiments, the marker sequence is a FLAG-tag, a peptide of sequence DYKDDDDK (SEQ ID NO:45) which can be used in conjunction with other affinity tags.

[0242] The present invention further relates to variants of the hereinabove described polynucleotides encoding, for example, fragments, analogs, and/or derivatives.

[0243] In certain embodiments, the present invention provides polynucleotides comprising polynucleotides having a nucleotide sequence at least about 80% identical, at least about 85% identical, at least about 90% identical, at least about 95% identical, and in some embodiments, at least about 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody), or fragment thereof, described herein.

[0244] As used herein, the phrase a polynucleotide having a nucleotide sequence at least, for example, 95% "identical" to a reference nucleotide sequence is intended to mean that the nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that the polynucleotide sequence can include up to five point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference sequence can be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 5% of the total nucleotides in the reference sequence can be inserted into the reference sequence. These mutations of the reference sequence can occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions,

interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

[0245] The polynucleotide variants can contain alterations in the coding regions, non-coding regions, or both. In some embodiments, a polynucleotide variant contains alterations which produce silent substitutions, additions, or deletions, but does not alter the properties or activities of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant comprises silent substitutions that results in no change to the amino acid sequence of the polypeptide (due to the degeneracy of the genetic code). Polynucleotide variants can be produced for a variety of reasons, for example, to optimize codon expression for a particular host (i.e., change codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as E. coli). In some embodiments, a polynucleotide variant comprises at least one silent mutation in a non-coding or a coding region of the sequence.

[0246] In some embodiments, a polynucleotide variant is produced to modulate or alter expression (or expression levels) of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant is produced to increase expression of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant is produced to decrease expression of the encoded polypeptide. In some embodiments, a polynucleotide variant has increased expression of the encoded polypeptide as compared to a parental polynucleotide sequence. In some embodiments, a polynucleotide variant has decreased expression of the encoded polypeptide as compared to a parental polynucleotide sequence.

[0247] In some embodiments, at least one polynucleotide variant is produced (without changing the amino acid sequence of the encoded polypeptide) to increase production of a heteromultimeric molecule. In some embodiments, at least one polynucleotide variant is produced (without changing the amino acid sequence of the encoded polypeptide) to increase production of a bispecific antibody.

[0248] In certain embodiments, the polynucleotides are isolated. In certain embodiments, the polynucleotides are substantially pure.

[0249] Vectors and cells comprising the polynucleotides described herein are also provided. In some embodiments, an expression vector comprises a polynucleotide molecule. In some embodiments, a host cell comprises an expression vector comprising the polynucleotide molecule. In some embodiments, a host cell comprises a polynucleotide molecule.

IV. Methods of use and pharmaceutical compositions

[0250] The -binding agents (including polypeptides and antibodies) of the invention that bind (e.g., specifically bind) VEGF and/or DLL4 are useful in a variety of applications including, but not limited to, therapeutic treatment methods, such as the treatment of cancer. In certain embodiments, the agents are useful for inhibiting VEGF activity, inhibiting DLL4-induced Notch signaling, inhibiting tumor growth, reducing tumor volume, reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, reducing the

tumorigenicity of a tumor, modulating angiogenesis, and/or inhibiting angiogenesis. The methods of use may be *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo*. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of human VEGF. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of human DLL4. In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent is an antagonist of both VEGF and DLL4.

[0251] In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are used in the treatment of a disease associated with angiogenesis, i.e. increased angiogenesis and/or aberrant angiogenesis. In certain embodiments, the disease is a disease dependent upon angiogenesis. In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agents are used in the treatment of disorders characterized by increased levels of stem cells and/or progenitor cells.

[0252] The present invention provides methods for inhibiting growth of a tumor using the VEGF/DLL4-binding agents or antibodies described herein. In certain embodiments, the method of inhibiting growth of a tumor comprises contacting a tumor cell with a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) *in vitro*. For example, an immortalized cell line or a cancer cell line is cultured in medium to which is added an anti-VEGF antibody, an anti-DLL4 antibody, or an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to inhibit tumor cell growth. In some embodiments, tumor cells are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and cultured in medium to which is added a VEGF/DLL4-binding agent to inhibit tumor cell growth.

[0253] In some embodiments, the method of inhibiting growth of a tumor comprises contacting a tumor or tumor cells with a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., antibody) *in vivo*. In certain embodiments, contacting a tumor or tumor cell with a VEGF/DLL4-binding agent is undertaken in an animal model. For example, an anti-VEGF antibody, an anti-DLL4 antibody, or an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody may be administered to an immunocompromised host animal (e.g., NOD/SCID mice) which has a tumor xenograft. In some embodiments, tumor cells and/or cancer stem cells are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and injected into an immunocompromised host animal (e.g., NOD/SCID mice) that is then administered a VEGF/DLL4-binding agent to inhibit tumor cell growth. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is administered at the same time or shortly after introduction of tumorigenic cells into the animal to prevent tumor growth ("preventative model"). In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is administered as a therapeutic after tumors have grown to a specified size ("therapeutic model"). In certain embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4.

[0254] In certain embodiments, the method of inhibiting growth of a tumor comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent. In certain embodiments, the subject is a human. In certain embodiments, the subject has a tumor or has had a tumor which was removed. In certain embodiments, the tumor comprises cancer stem cells. In certain embodiments, the

frequency of cancer stem cells in the tumor is reduced by administration of the VEGF/DLL4-binding agent. The invention also provides a method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor, comprising contacting the tumor with an effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody). In some embodiments, a method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor in a subject, comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent.

[0255] In some embodiments, the tumor is a solid tumor. In certain embodiments, the tumor is a tumor selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, pancreatic tumor, lung tumor, ovarian tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor. In certain embodiments, the tumor is a colorectal tumor or a colon tumor. In certain embodiments, the tumor is an ovarian tumor. In some embodiments, the tumor is a lung tumor. In certain embodiments, the tumor is a pancreatic tumor. In certain embodiments, the tumor is a breast tumor.

[0256] The present invention further provides methods for treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent to a subject. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds VEGF, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds DLL4, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds VEGF and DLL4, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds VEGF, interferes with VEGF/VEGF receptor interactions, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds DLL4, interferes with DLL4/Notch interactions, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds both VEGF and DLL4, interferes with VEGF/VEGF receptor interactions and with DLL4/Notch interactions, and inhibits or reduces growth of the cancer. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent binds DLL4, and reduces the frequency of cancer stem cells in the cancer.

[0257] The present invention provides methods of treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent to a subject (e.g., a subject in need of treatment). In certain embodiments, the subject is a human. In certain embodiments, the subject has a cancerous tumor. In certain embodiments, the subject has had a tumor removed.

[0258] The subject's cancer/tumor, may, in some embodiments, be refractory to certain treatment(s). As a non-limiting example, the subject's cancer (or tumor) may be chemorefractory. In certain embodiments, the subject's cancer may be resistant to anti-VEGF therapy or anti-DLL4 therapy, or both.

[0259] In certain embodiments, the cancer is a cancer selected from the group consisting of colorectal cancer, pancreatic cancer, lung cancer, ovarian cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate

cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, and head and neck cancer. In certain embodiments, the cancer is ovarian cancer. In certain embodiments, the cancer is colorectal cancer or colon cancer. In certain embodiments, the cancer is pancreatic cancer. In certain embodiments, the cancer is breast cancer. In certain embodiments, the cancer is prostate cancer. In certain embodiments, the cancer is lung cancer. In some embodiments, the cancer is a hematologic cancer such as leukemia or lymphoma. In some embodiments, the leukemia or lymphoma is a B-cell leukemia or lymphoma. In some embodiments, the leukemia or lymphoma is a T-cell leukemia or lymphoma. In some embodiments the hematologic cancer is acute myelogenous leukemia, Hodgkin lymphoma, non-Hodgkins's lymphoma, acute lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, cutaneous T-cell lymphoma, or T-cell acute lymphoblastic leukemia.

[0260] The invention also provides methods of treating a disease or disorder in a subject, wherein the disease or disorder is associated with angiogenesis. In some embodiments, the disease or disorder is associated with aberrant angiogenesis. In some embodiments, the disease or disorder is associated with increased angiogenesis. Thus, the present invention provides methods for modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of any of the VEGF/DLL4-binding agents described herein. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody that binds human DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds human VEGF. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds human DLL4. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that binds human VEGF and human DLL4.

[0261] Methods of treating a disease or disorder in a subject, wherein the disease or disorder is characterized by an increased level of stem cells and/or progenitor cells are further provided. In some embodiments, the treatment methods comprise administering a therapeutically effective amount of a VEGF/DLL4-binding agent, polypeptide, or antibody to the subject.

[0262] In certain embodiments of any of the methods described herein, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4. In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY

(SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and second antigen-binding site which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). In some embodiments, the bispecific antibody comprises a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF and a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-

binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), and the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

[0263] In certain embodiments of any of the methods described herein, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64, and a first and a light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:9, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:10, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:58, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12. In some embodiments, the VEGF/DLL4 bispecific antibody comprises a first heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:11, a second heavy chain variable region having at least about 80% sequence identity to SEQ ID NO:64, and a first and a second light chain variable region having at least 80% sequence identity to SEQ ID NO:12.

[0264] In some embodiments of any of the methods described herein, the VEGF/DLL4-binding agent is an antibody. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an anti-VEGF antibody. In some embodiments, the anti-VEGF antibody is antibody 219R45. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is antibody 21R79. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is antibody 21R75. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 219R45. In some embodiments, the

VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising an antigen-binding site from antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21M18. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is a bispecific antibody comprising a first antigen-binding site from antibody 219R45 and a second antigen-binding site from antibody 21R83. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21M18. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21R79. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21R75. In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent is the bispecific antibody 219R45-MB-21R83.

[0265] The present invention further provides pharmaceutical compositions comprising the binding agents described herein. In certain embodiments, the pharmaceutical compositions further comprise a pharmaceutically acceptable vehicle. These pharmaceutical compositions find use in inhibiting tumor growth and/or treating cancer in a subject (e.g., a human patient).

[0266] In certain embodiments, the invention provides pharmaceutical compositions comprising bispecific antibodies, wherein at least about 90%, at least about 95%, at least about 98%, at least about 99% of the antibodies in the composition are bispecific antibodies or heterodimeric antibodies. In certain embodiments, the bispecific antibodies are IgG (e.g., IgG2 or IgG1) antibodies. In certain embodiments, less than about 10%, less than about 5%, less than about 2% or less than about 1% of the total antibodies in the compositions are monospecific antibodies or homodimeric antibodies. In certain embodiments, the antibodies in the composition are at least about 98% heterodimeric.

[0267] In certain embodiments, formulations are prepared for storage and use by combining a purified antibody or agent of the present invention with a pharmaceutically acceptable vehicle (e.g., a carrier or excipient). Suitable pharmaceutically acceptable vehicles include, but are not limited to, non-toxic buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, phenol, butyl or benzyl alcohol, alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol, and m-cresol; low molecular weight polypeptides (e.g., less than about 10 amino acid residues); proteins such as

serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; carbohydrates such as monosaccharides, disaccharides, glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes such as Zn-protein complexes; and non-ionic surfactants such as TWEEN or polyethylene glycol (PEG). (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition*, 2005, University of the Sciences, Philadelphia, PA).

[0268] The pharmaceutical compositions of the present invention can be administered in any number of ways for either local or systemic treatment. Administration can be topical by epidermal or transdermal patches, ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids, and powders; pulmonary by inhalation or insufflation of powders or aerosols, including by nebulizer, intratracheal, and intranasal; oral; or parenteral including intravenous, intraarterial, intratumoral, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular (e.g., injection or infusion), or intracranial (e.g., intrathecal or intraventricular).

[0269] The therapeutic formulation can be in unit dosage form. Such formulations include tablets, pills, capsules, powders, granules, solutions or suspensions in water or non-aqueous media, or suppositories. In solid compositions such as tablets the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical carrier. Conventional tableting ingredients include corn starch, lactose, sucrose, sorbitol, talc, stearic acid, magnesium stearate, dicalcium phosphate or gums, and diluents (e.g., water). These can be used to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention, or a non-toxic pharmaceutically acceptable salt thereof. The solid preformulation composition is then subdivided into unit dosage forms of a type described above. The tablets, pills, etc. of the formulation or composition can be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner composition covered by an outer component. Furthermore, the two components can be separated by an enteric layer that serves to resist disintegration and permits the inner component to pass intact through the stomach or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials include a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol and cellulose acetate.

[0270] The VEGF/DLL4-binding agents or antibodies described herein can also be entrapped in microcapsules. Such microcapsules are prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles and nanocapsules) or in macroemulsions as described in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, *21st Edition*, 2005, University of the Sciences in Philadelphia, PA.

[0271] In certain embodiments, pharmaceutical formulations include a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) of the present invention complexed with liposomes. Methods to produce liposomes are known to those of skill in the art. For example, some liposomes can be generated by reverse phase evaporation with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes can be extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

[0272] In certain embodiments, sustained-release preparations can be produced. Suitable examples of sustained-release preparations include semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody), where the matrices are in the form of shaped articles (e.g., films or microcapsules). Additional examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels such as poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) or poly(vinyl alcohol), polylactides, copolymers of L-glutamic acid and 7 ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

[0273] In certain embodiments, in addition to administering a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody), the method or treatment further comprises administering at least one additional therapeutic agent. An additional therapeutic agent can be administered prior to, concurrently with, and/or subsequently to, administration of the VEGF/DLL4-binding agent. Pharmaceutical compositions comprising a VEGF/DLL4-binding agent and the additional therapeutic agent(s) are also provided. In some embodiments, the at least one additional therapeutic agent comprises 1, 2, 3, or more additional therapeutic agents.

[0274] Combination therapy with at least two therapeutic agents often uses agents that work by different mechanisms of action, although this is not required. Combination therapy using agents with different mechanisms of action may result in additive or synergetic effects. Combination therapy may allow for a lower dose of each agent than is used in monotherapy, thereby reducing toxic side effects and/or increasing the therapeutic index of at least one of the agents. Combination therapy may decrease the likelihood that resistant cancer cells will develop. In some embodiments, combination therapy comprises a therapeutic agent that primarily affects (e.g., inhibits or kills) non-tumorigenic cells and a therapeutic agent that primarily affects (e.g., inhibits or kills) tumorigenic CSCs.

[0275] Useful classes of therapeutic agents include, for example, antitubulin agents, auristatins, DNA minor groove binders, DNA replication inhibitors, alkylating agents (e.g., platinum complexes such as cisplatin, mono(platinum), bis(platinum) and tri-nuclear platinum complexes and carboplatin), anthracyclines, antibiotics, antifolates, antimetabolites, chemotherapy sensitizers, duocarmycins, etoposides, fluorinated pyrimidines, ionophores, lexitropsins, nitrosoureas, platinols, purine

antimetabolites, puromycins, radiation sensitizers, steroids, taxanes, topoisomerase inhibitors, vinca alkaloids, or the like. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an alkylating agent, an antimetabolite, an antimitotic, a topoisomerase inhibitor, or an angiogenesis inhibitor. In some embodiments, the second therapeutic agent is a platinum complex such as carboplatin or cisplatin. In some embodiments, the additional therapeutic agent is a platinum complex in combination with a taxane.

[0276] Therapeutic agents that may be administered in combination with the VEGF/DLL4-binding agents include chemotherapeutic agents. Thus, in some embodiments, the method or treatment involves the administration of an anti-VEGF-binding agent or antibody of the present invention in combination with a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents. In some embodiments, the method or treatment involves the administration of an anti-DLL4-binding agent or antibody of the present invention in combination with a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents. In some embodiments, the method or treatment involves the administration of a bispecific antibody of the present invention that binds VEGF and DLL4 in combination with a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents.

[0277] Chemotherapeutic agents useful in the instant invention include, but are not limited to, alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide (CYTOXAN); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphaoramide and trimethylolomelamime; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabicin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytosine arabinoside, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenishers such as folinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; etoglucid;

gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK; razoxane; sizofuran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside (Ara-C); taxoids, e.g. paclitaxel (TAXOL) and docetaxel (TAXOTERE); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; ibandronate; CPT11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine (XELODA); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Chemotherapeutic agents also include anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including, for example, tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (FARESTON); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. In certain embodiments, the second therapeutic agent is cisplatin. In certain embodiments, the second therapeutic agent is carboplatin. In certain embodiments, the second therapeutic agent is paclitaxel.

[0278] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is a topoisomerase inhibitor. Topoisomerase inhibitors are chemotherapeutic agents that interfere with the action of a topoisomerase enzyme (e.g., topoisomerase I or II). Topoisomerase inhibitors include, but are not limited to, doxorubicin HCl, daunorubicin citrate, mitoxantrone HCl, actinomycin D, etoposide, topotecan HCl, teniposide (VM-26), and irinotecan, as well as pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of these. In certain embodiments, the second therapeutic agent is irinotecan.

[0279] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is an anti-metabolite. An anti-metabolite is a chemical with a structure that is similar to a metabolite required for normal biochemical reactions, yet different enough to interfere with one or more normal functions of cells, such as cell division. Anti-metabolites include, but are not limited to, gemcitabine, fluorouracil, capecitabine, methotrexate sodium, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, cytosine arabinoside, thioguanine, 5-azacytidine, 6-mercaptopurine, azathioprine, 6-thioguanine, pentostatin, fludarabine phosphate, and cladribine, as well as pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of these. In certain embodiments, the second therapeutic agent is gemcitabine.

[0280] In certain embodiments, the chemotherapeutic agent is an antimitotic agent, including, but not limited to, agents that bind tubulin. In some embodiments, the agent is a taxane. In certain embodiments, the agent is paclitaxel or docetaxel, or a pharmaceutically acceptable salt, acid, or derivative of paclitaxel or docetaxel. In certain embodiments, the agent is paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE),

albumin-bound paclitaxel (ABRAXANE), DHA-paclitaxel, or PG-paclitaxel. In certain alternative embodiments, the antimitotic agent comprises a vinca alkaloid, such as vincristine, binblastine, vinorelbine, or vindesine, or pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives thereof. In some embodiments, the antimitotic agent is an inhibitor of kinesin Eg5 or an inhibitor of a mitotic kinase such as Aurora A or Plk1. In certain embodiments, where the chemotherapeutic agent administered in combination with a VEGF/DLL4-binding agent is an anti-mitotic agent, the cancer or tumor being treated is breast cancer or a breast tumor.

[0281] In some embodiments, a second therapeutic agent comprises an agent such as a small molecule. For example, treatment can involve the combined administration of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g. an antibody) of the present invention with a small molecule that acts as an inhibitor against additional tumor-associated proteins including, but not limited to, EGFR, ErbB2, HER2, and/or VEGF. In certain embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule that inhibits a cancer stem cell pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule inhibitor of the Notch pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule inhibitor of the Wnt pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule inhibitor of the BMP pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is a small molecule that inhibits β-catenin signaling.

[0282] In some embodiments, a second therapeutic agent comprises a biological molecule, such as an antibody. For example, treatment can involve the combined administration of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g. an antibody) of the present invention with other antibodies against additional tumor-associated proteins including, but not limited to, antibodies that bind EGFR, ErbB2, HER2, and/or VEGF. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that is an anti-cancer stem cell marker antibody. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that binds a component of the Notch pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that binds a component of the Wnt pathway. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that inhibits a cancer stem cell pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody inhibitor of the Notch pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody inhibitor of the Wnt pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody inhibitor of the BMP pathway. In some embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that inhibits β-catenin signaling. In certain embodiments, the second therapeutic agent is an antibody that is an angiogenesis inhibitor or modulator (e.g., an anti-VEGF or VEGF receptor antibody). In certain embodiments, the second therapeutic agent is bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX), or cetuximab (ERBITUX). Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously.

[0283] Furthermore, treatment with a VEGF/DLL4-binding agent described herein can include combination treatment with other biologic molecules, such as one or more cytokines (e.g., lymphokines, interleukins, tumor necrosis factors, and/or growth factors) or can be accompanied by surgical removal of tumors, cancer cells, or any other therapy deemed necessary by a treating physician.

[0284] In certain embodiments, the treatment involves the administration of a VEGF/DLL4-binding agent (e.g. an antibody) of the present invention in combination with radiation therapy. Treatment with a VEGF/DLL4-binding agent can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of radiation therapy. Dosing schedules for such radiation therapy can be determined by the skilled medical practitioner.

[0285] It will be appreciated that the combination of a VEGF/DLL4-binding agent and an additional therapeutic agent may be administered in any order or concurrently. Treatment with a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of chemotherapies. Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents can be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in *The Chemotherapy Source Book, 4th Edition*, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

[0286] In some embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent will be administered to patients that have previously undergone treatment with a second therapeutic agent. In certain other embodiments, the VEGF/DLL4-binding agent and a second therapeutic agent will be administered substantially simultaneously or concurrently. For example, a subject may be given a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) while undergoing a course of treatment with a second therapeutic agent (e.g., chemotherapy). In certain embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 1 year of the treatment with a second therapeutic agent. In certain alternative embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 10, 8, 6, 4, or 2 months of any treatment with a second therapeutic agent. In certain other embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 4, 3, 2, or 1 weeks of any treatment with a second therapeutic agent. In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent will be administered within 5, 4, 3, 2, or 1 days of any treatment with a second therapeutic agent. It will further be appreciated that the two (or more) agents or treatments may be administered to the subject within a matter of hours or minutes (i.e., substantially simultaneously).

[0287] For the treatment of a disease, the appropriate dosage of an VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) of the present invention depends on the type of disease to be treated, the severity and course of the disease, the responsiveness of the disease, whether the VEGF/DLL4-binding agent or antibody is

administered for therapeutic or preventative purposes, previous therapy, the patient's clinical history, and so on, all at the discretion of the treating physician. The VEGF/DLL4-binding agent or antibody can be administered one time or as a series of treatments spread over several days to several months, or until a cure is effected or a diminution of the disease state is achieved (e.g., reduction in tumor size). Optimal dosing schedules can be calculated from measurements of drug accumulation in the body of the patient and will vary depending on the relative potency of an individual antibody or agent. The administering physician can determine optimum dosages, dosing methodologies, and repetition rates. In certain embodiments, dosage of a VEGF/DLL4-binding agent or antibody is from about 0.01μg to about 100mg/kg of body weight, from about 0.1μg to about 100mg/kg of body weight, from about 1μg to about 100mg/kg of body weight, from about 1mg to about 100mg/kg of body weight, about 1mg to about 80mg/kg of body weight from about 10mg to about 100mg/kg of body weight, from about 10mg to about 75mg/kg of body weight, or from about 10mg to about 50mg/kg of body weight. In certain embodiments, the dosage of the antibody or other VEGF/DLL4-binding agent is from about 0.1mg to about 20mg/kg of body weight. In certain embodiments, dosage can be given once or more daily, weekly, monthly, or yearly. In certain embodiments, the antibody or other VEGF/DLL4-binding agent is given once every week, once every two weeks, once every three weeks, or once every month.

[0288] In some embodiments, a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an antibody) may be administered at an initial higher "loading" dose, followed by one or more lower doses. In some embodiments, the frequency of administration may also change. In some embodiments, a dosing regimen may comprise administering an initial dose, followed by additional doses (or "maintenance" doses) once a week, once every two weeks, once every three weeks, or once every month. For example, a dosing regimen may comprise administering an initial loading dose, followed by a weekly maintenance dose of, for example, one-half of the initial dose. Or a dosing regimen may comprise administering an initial loading dose, followed by maintenance doses of, for example one-half of the initial dose every other week. Or a dosing regimen may comprise administering three initial doses for 3 weeks, followed by maintenance doses of, for example, the same amount every other week. Or a dosing regimen may comprise administering an initial dose followed by additional doses every 3 weeks or once a month. The treating physician can estimate repetition rates for dosing based on measured residence times and concentrations of the drug in bodily fluids or tissues. The progress of therapy can be monitored by conventional techniques and assays.

[0289] As is known to those of skill in the art, administration of any therapeutic agent may lead to side effects and/or toxicities. In some cases, the side effects and/or toxicities are so severe as to preclude administration of the particular agent at a therapeutically effective dose. In some cases, drug therapy must be discontinued, and other agents may be tried. However, many agents in the same therapeutic class often display similar side effects and/or toxicities, meaning that the patient either has to stop therapy, or if possible, suffer from the unpleasant side effects associated with the therapeutic agent.

[0290] Side effects from therapeutic agents may include, but are not limited to, hives, skin rashes, itching, nausea, vomiting, decreased appetite, diarrhea, chills, fever, fatigue, muscle aches and pain, headaches, low blood pressure, high blood pressure, hypokalemia, low blood counts, bleeding, and cardiac problems.

[0291] Thus, one aspect of the present invention is directed to methods of treating cancer in a patient comprising administering an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen, which may reduce side effects and/or toxicities associated with administration of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody. As used herein, "intermittent dosing" refers to a dosing regimen using a dosing interval of more than once a week, e.g., dosing once every 2 weeks, once every 3 weeks, once every 4 weeks, etc. In some embodiments, a method for treating cancer in a human patient comprises administering to the patient an effective dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody according to an intermittent dosing regimen. In some embodiments, a method for treating cancer in a human patient comprises administering to the patient an effective dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody according to an intermittent dosing regimen, and increasing the therapeutic index of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises administering an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to the patient, and administering subsequent doses of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody about once every 2 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises administering an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to the patient, and administering subsequent doses of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody about once every 3 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises administering an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody to the patient, and administering subsequent doses of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody about once every 4 weeks.

[0292] In some embodiments, the subsequent doses in an intermittent dosing regimen are about the same amount or less than the initial dose. In other embodiments, the subsequent doses are a greater amount than the initial dose. As is known by those of skill in the art, doses used will vary depending on the clinical goals to be achieved. In some embodiments, the initial dose is about 0.25mg/kg to about 20mg/kg. In some embodiments, the initial dose is about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 0.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 1mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 2.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 7.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 10mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 12.5mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 15mg/kg. In certain embodiments, the initial dose is about 20mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 0.25mg/kg to about 15mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses

are about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 0.5mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 1mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 2.5mg/kg. In certain embodiments, the subsequent doses are about 5mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 7.5mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 10mg/kg. In some embodiments, the subsequent doses are about 12.5mg/kg.

[0293] In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 2.5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 2.5 mg/kg once every 2 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 5 mg/kg once every 2 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 2.5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 2.5 mg/kg once every 3 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 5 mg/kg once every 3 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 2.5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 2.5 mg/kg once every 4 weeks. In some embodiments, the intermittent dosing regimen comprises: (a) administering to the patient an initial dose of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody of about 5mg/kg and (b) administering subsequent doses of about 5 mg/kg once every 4 weeks. In certain embodiments, the initial dose and the maintenance doses are different, for example, the initial dose is about 5mg/kg and the subsequent doses are about 2.5mg/kg. In certain embodiments, an intermittent dosing regimen may comprise a loading dose, for example, the initial dose is about 20mg/kg and the subsequent doses are about 2.5mg/kg or about 5mg/kg administered once every 2 weeks, once every 3 weeks, or once every 4 weeks.

[0294] Another aspect of the present invention is directed to methods for reducing toxicity of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody in a human patient comprises administering to the patient the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen. Another aspect of the present invention is directed to methods for reducing side effects of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody in a human patient comprises administering to the patient the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen. Another aspect of the present invention is directed to methods for increasing the therapeutic index of an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody in a human patient comprises administering to the patient the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody using an intermittent dosing regimen.

[0295] The choice of delivery method for the initial and subsequent doses is made according to the ability of the animal or human patient to tolerate introduction of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody into the body. Thus, in any of the aspects and/or embodiments described herein, the administration of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody may be by intravenous injection or intravenously. In some embodiments, the administration is by intravenous infusion. In any of the aspects and/or embodiments described herein, the administration of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody may be by a non-intravenous route.

V. Kits comprising VEGF/DLL4-binding agents

[0296] The present invention provides kits that comprise the VEGF/DLL4-binding agents (e.g., antibodies) described herein and that can be used to perform the methods described herein. In certain embodiments, a kit comprises at least one purified antibody against VEGF and/or DLL4 in one or more containers. In some embodiments, the kits contain all of the components necessary and/or sufficient to perform a detection assay, including all controls, directions for performing assays, and any necessary software for analysis and presentation of results. One skilled in the art will readily recognize that the disclosed VEGF/DLL4-binding agents of the present invention can be readily incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

[0297] Further provided are kits comprising a VEGF/DLL4-binding agent (e.g., an anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody), as well as at least one additional therapeutic agent. In certain embodiments, the second (or more) therapeutic agent is a chemotherapeutic agent. In certain embodiments, the second (or more) therapeutic agent is an angiogenesis inhibitor.

[0298] Embodiments of the present disclosure can be further defined by reference to the following non-limiting examples, which describe in detail preparation of certain antibodies of the present disclosure and methods for using antibodies of the present disclosure. It will be apparent to those skilled in the art that many modifications, both to materials and methods, may be practiced without departing from the scope of the present disclosure.

EXAMPLES

Example 1

Binding affinities of anti-VEGF/anti-DLL4 antibodies

[0299] The K_Ds of parental antibodies anti-VEGF 219R45 (IgG format), anti-DLL4 21R79 (IgG format), anti-DLL4 21M18 (IgG format) and bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 were determined using a Biacore 2000 system from Biacore LifeSciences (GE Healthcare). Recombinant human DLL4-Fc or mouse DLL4-Fc proteins were immobilized on CM5 carboxyl chips using standard amine-based chemistry (NHS/EDC) and blocked with ethanolamine. Recombinant human $VEGF_{165}$ or

mouse $VEGF_{165}$ were biotinylated and immobilized on streptavidin chips. The antibodies were serially diluted 2-fold from 100nM to 0.78nM in HBS-P (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005% v/v Polysorbate 20). For each antibody, all 8 dilutions were sequentially injected over a specific chip. Kinetic data were collected over time and were fit using the simultaneous global fit equation to yield affinity constants (K_D values) for each bispecific antibody.

Table 3

Antibody	hVEGF (nM)	mVEGF(nM)	hDLL4 (nM)	mDLL4 (nM)
219R45	0.67	22.9	NB	NB
21M18	NB	NB	<0.1	NB
21R79	NB	NB	<0.1	NB
219R45-MB-21M18	0.36	25.5	16	NB
219R45-MB-21R79	0.68	12.5	0.53	NB

[0300] As shown in Table 3, bispecific antibody 219R45-MB-21M18 had an affinity constant (K_D) for human VEGF of 0.36nM and a K_D for human DLL4 of 16nM. Bispecific antibody 219R45-MB-21R79 had a K_D for human VEGF of 0.68nM and a K_D for human DLL4 of 0.53nM. Both bispecific antibodies demonstrated weaker binding to mouse VEGF as compared to human VEGF and neither antibody bound mouse DLL4. Thus, both bispecific antibodies demonstrated similar binding affinity to human VEGF and 219R45-MB-21R79 demonstrated approximately 30-fold stronger binding to human DLL4 than 219R45-MB-21M18. Furthermore, bispecific antibody 219R45-MB-21R79 had a similar binding affinity to human VEGF despite the fact the bispecific antibody is monovalent for VEGF as compared to the bivalent parental antibody.

[0301] Several additional anti-DLL4 antibodies were identified that had binding affinities intermediate to the K_Ds of 21M18 and 21R79. Two of these anti-DLL4 antibodies were used to produce anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21R75 and 219R45-MB-21R83. Using the Biacore 2000 system as described above, the K_Ds of the bispecific antibodies 219R45-MB-21R75 and 219R45-MB-21R83 to human DLL4 were determined. A comparison of the binding affinity to human DLL4 of these four anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies is shown in Table 4.

[0302] The CDRs for anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 are shown in Figure 1A. The heavy chain and light chain variable region SEQ ID NOs are shown in Figure 1B and the heavy chain and light chain SEQ ID NOs (with and without signal sequence) are shown in Figure 1C.

[0303] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 comprises a (a) heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:75 deposited with American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA, under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ , (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

[0304] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79 comprises a (a) heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:31 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

[0305] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R83 comprises (a) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:72 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on _____ and assigned designation number PTA-____, (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

[0306] Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R75 comprises (a) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:74 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, (b) a heavy chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:33 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____, and (c) a light chain encoded by the DNA comprising SEQ ID NO:34 deposited with ATCC under the conditions of the Budapest Treaty on September 21, 2012 and assigned designation number PTA-____ .

Table 4

Antibody	Heavy chain CDR2	hDLL4 (nM)
219R45-MB-21M18	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	16.00
219R45-MB-21R79	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	0.53

219R45-MB-21R75	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	5.10
219R45-MB-21R83	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	1.30

Example 2

HTRF Assay for simultaneous binding of bispecific antibodies to human VEGF and human DLL4

[0307] To characterize the binding capabilities of certain antibodies and/or antibody mixtures to both VEGF and DLL4, homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) assays were performed. Antibodies tested were anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, parental antibodies 219R45 (anti-VEGF), 21M18 (anti-DLL4), 21R79 (anti-DLL4), a combination of 219R45 and 21M18, or a combination of 219R45 and 21R79. The antibodies or antibody mixtures were serially diluted 2-fold from 3000nM to 2.9nM in binding buffer (1X PBS, 0.1% gelatin, 0.1% Polysorbate 20, 400mM potassium fluoride) and placed in a white 96-well plate. An equal volume of solution containing 4μg/ml of d2-labeled hDLL4-Fc and 21.4ng/ml Europium crypate-labeled $hVEGF_{165}$ was added to each well for a final volume of 100μl (final concentrations of acceptor and donor fluorophores were 2μg/ml and 10.7ng/ml, respectively). The assay plates were incubated for 2 hours to overnight and read on a SpectraMax M5e Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) at an excitation wavelength of 314nm.

[0308] As shown in Figure 2, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, were able to bind both hVEGF and hDLL4 simultaneously. Importantly, neither of the combinations of the parental antibodies (i.e., 219R45 and 21M18 or 219R45 and 21R79) was able to bind VEGF and DLL4 simultaneously. These results clearly demonstrate that the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 are capable of functioning differently than just a mixture of the two individual antibodies.

Example 3

Inhibition of HUVEC proliferation by anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies

[0309] HUVEC cells were obtained from Lonza (Walkersville MD) and cultured in growth media (M199, 10% heat-inactivated FBS (HI-FBS), 50μg/ml EGS, 1X heparin, 1mM L-glutamine). For the HUVEC proliferation assay, a 96-well plate was pre-coated with 50μl of 10μg/ml rat tail collagen type I solution (collagen I in 0.02N acetic acid) and incubated at 4°C overnight. After incubation, the plate was thoroughly aspirated to remove unbound collagen I solution and washed once with 200μl DPBS. The HUVEC cells were removed from the surface of the growth flasks using an endothelial cell subclone reagent and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes at 4°C. The cells were resuspended in starvation/assay medium (M199 and 2% HI-FBS, 1X heparin, 5U/ml heparin-glutamine) at a density of 10^5 cells/ml. The cells were seeded into the collagen-coated assay plate at 5000 cells/well, 50ul/well. The cells were

incubated for 3 hours at 37°C, washed one time, refed with 100ul assay media, and incubated overnight at 37°C. The next day, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, parental antibody 219R45, or control antibody LZ1 were prepared in a mixture with human VEGF (R&D Biosystems, Minneapolis MN). The antibodies were serially diluted 5-fold from 20μM to 0.25nM in assay buffer in combination with hVEGF (final concentration 5ng/ml). The mixture was pre-incubated at 37°C for 2 hours. The medium was removed from the assay plate, and 100μl of the antibody/hVEGF mixture was added to each well. After 3-4 days incubation, medium was removed and a fresh aliquot of the antibody/hVEGF mixture was added to each well and allowed to incubate for another 4 days. On day 7, 20μl of Alamar Blue reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to each well and incubated at 37°C for 5-6 hours. The plate was read with a SpectraMax M5e Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) using a excitation wavelength of 539nm and an emission wavelength of 590nm.

[0310] As shown in Figure 3, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, as well as parental anti-VEGF antibody 219R45 inhibited HUVEC proliferation. These results demonstrated that the bispecific antibodies were capable of inhibiting VEGF-induced proliferation of HUVEC cells.

Example 4

Inhibition of DLL4-induced Notch signalling by bispecific antibodies

[0311] Human PC3 cells were transfected with an expression vector encoding a full-length human Notch2 receptor and a firefly luciferase reporter vector (8xCBF-luciferase reporter) that is responsive to Notch signaling. The cells were also transfected with a Renilla luciferase reporter (Promega, Madison WI) as an internal control for transfection efficiency. Purified human DLL4 protein was coated onto 96-well plates at 100ng/well and Notch2-expressing PC3-luc cells were added to the wells. Anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, parental anti-DLL4 antibodies 21M18, 21R79 or a control antibody LZ1 were serially diluted 5-fold from 20ug/ml to 0.064ug/ml, added to the appropriate wells, and incubated overnight. Luciferase activity was determined using a dual luciferase assay kit (Promega, Madison, WI) with firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity.

[0312] As shown in Figure 4, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79 and parental anti-DLL4 antibodies 21M18 and 21R79 inhibited DLL4-induced Notch signaling. Bispecific antibody 219R45-MB-21M18 inhibited DLL4-induced Notch signaling only at high antibody concentrations. These results demonstrated that bispecific antibody 219R45-MB-21R79, and to a lesser extent bispecific antibody 219R45-MB-21M18, were capable of inhibiting DLL4-induced Notch signaling. Thus, in combination with the results presented in Example 3, the anti-VEGF/anti-DLL4

bispecific antibodies 219R45-MB-21R79 and 219R45-MB-21M18 have demonstrated the ability to inhibit both VEGF-induced and DLL4-induced signaling and/or proliferation functions.

Example 5

Inhibition of tumor growth *in vivo* by a bispecific antibody in a human skin graft model

[0313] A human skin graft model has been reported which comprises a human skin graft and human tumor cells. A human skin graft is established and then human tumor cells are implanted into the skin graft, allowing the tumor cells to grow in an environment with human stroma and vasculature (Tahtis et al., 2003, Mol. Cancer Ther. 2:229-737). Human skin samples were obtained from neonatal foreskin tissue and grafted onto the lateral flank of NOD-SCID mice. After establishment of the skin graft, luciferase-labeled OMP-C8 colon tumor cells (20,000 cells) were injected intradermally into the human skin. Tumor growth was monitored by bioluminescence imaging using an IVIS imaging system (Caliper Life Sciences, Mountain View, CA). Tumors were allowed to grow until they reached 1.2 x 10^6 photons per second. Tumor-bearing mice (n = 6 mice/group) were randomized and treated with control Ab, anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18. Animals were treated once a week and antibodies were administered intraperitoneally at a dose of 25mg/kg. Tumor growth was monitored by bioluminescence imaging on the indicated days.

[0314] As shown in Figure 5, both anti-hDLL4 antibody 21M18 and anti-VEGF antibody bevacizumab inhibited tumor growth in this human skin graft/human tumor model. Furthermore, bispecific anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 was more effective than either the anti-DLL4 antibody or the anti-VEGF antibody alone. These data demonstrate the utility of simultaneously targeting DLL4 and VEGF with a bispecific antibody.

Example 6

Tumorigenicity of OMP-PN8 pancreatic tumor cells after treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies

[0315] Mice bearing OMP-PN8 pancreatic tumors were treated with control antibody (15 mg/kg), anti-hDLL4 antibody 21M18 (15 mg/kg), anti-VEGF antibody bevacizumab (15 mg/kg), or anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 or 219R45-MB-21R79 (30 mg/kg) with or without gemcitabine (70 mg/kg). Following four weeks of treatment, tumors were harvested, processed to single cell suspensions and the human tumor cells were purified by immunomagnetic depletion of murine cells. 90 human tumor cells from each treatment group were transferred to a new cohort of mice (n = 10 mice/group). Tumors were allowed to grow for 55 days without any treatment and tumor volumes were measured with electronic calipers.

[0316] Figure 6 shows the tumor volume from the individual mice in each group. Cells isolated from mice treated with anti-hDLL4 antibody 21M18 had greatly decreased tumorigenicity, 5 out of 10 mice had tumors, as compared to cells isolated from mice treated with control antibody where 9 out of 10 mice had tumors. The reduction in tumor growth frequency indicates a reduction in cancer stem cell frequency. In contrast, bevacizumab treatment resulted in no reduction of tumor growth frequency, 10 out of 10 mice had tumors. Similar to bevacizumab, treatment with gemcitabine as a single agent had no effect on tumor growth frequency as 10 out of 10 mice had tumors. The anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 both reduced tumor growth frequency (5 out of 10 mice had tumors and 4 out of 10 mice had tumors, respectively). Combination treatment with gemcitabine appeared to have no effect on tumor growth frequency. These data indicate that targeting DLL4 reduces cancer stem cell frequency while targeting VEGF alone does not. Importantly, these data indicate that the anti-CSC activity of the anti-DLL4 antibody is retained in a bispecific antibody.

Example 7

Bispecific Antibody ELISA

[0317] VEGF (ATGEN, South Korea) was coated onto Nunc maxisorb plates at 2ug/ml (100µl/well) and incubated overnight at 2-8°C. Bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83 were diluted in blocking buffer (1x PBS, 0.1% gelatin, 0.1% Polysorbate-20, pH 7.4) containing 2µg/ml biotin-DLL4-hFc. The antibodies were serially diluted 3-fold from 500ng/ml to 0.008ng/ml. The antibody samples were incubated for 2 hours in blocking buffer containing the biotin-DLL4-hFc. After incubation, the antibody samples were transferred to the VEGF-coated assay plate (100 ul/well) and incubated for 2 hours. Streptavidin-HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was added to each well and incubated for 1 hr. TMB substrate was added to the wells with a 10 minute color development and the reaction was stopped with 2M sulfuric acid. Absorbance was read at 450–650nm and the data analyzed using the 4-parameter fit within the Softmax Pro analysis program (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0318] Figure 7 shows the titration curves of bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 (open circles), 219R45-MB-21R79 (open squares), 219R45-MB-21R75 (open triangles), and 219R45-MB-21R83 (open diamonds) in comparison to a reference anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody (solid circles). Relative potencies for the bispecific antibodies as compared to the reference bispecific antibody are shown in Table 5.

Table 5

Antibody	Relative Potency (%)
219R45-MB-21M18	67
219R45-MB-21R79	501

219R45-MB-21R75	422
219R45-MB-21R83	222

[0319] Bispecific antibody 219R45-MB-21R79 was the most potent, about 7-fold more potent than 219R45-MB-21M18, which reflected the higher affinity of the 21R79 antigen-binding site.

Example 8

Bispecific Antibody Production

[0320] Bispecific antibodies were produced using a GS-CHO cell line. CHOK1SV cells (Lonza Biologics) were transfected via electroporation with the gene(s) of interest coupled with glutamine synthetase (GS) as the selectable marker. Transfectants and subclones were screened for antibody productivity and the high producers were selected for scaled-up production. Cells were grown using a fed-batch process and fed-batch bioreactors. Accumulated antibody in harvested cell culture fluid (HCCF) was isolated and purified using chromatography techniques.

[0321] Bispecific antibody cell lines 219R45-MB-21M18.010.017 and 219R45-MB-21R79.017.003 were cultured in 5L stirred tank bioreactors for 14 days. Cell line 219R45-MB-21M18.010.017 produced a final antibody titer of 3.0g/L and cell line 219R45-MB-21R79.017.003 produced a final antibody titer of 0.8g/L. Cell lines 219R45-MB-21R75.101 and 219R45-MB-21R83.113 were cultured in 25L WAVE bioreactor systems (GE Healthcare) using a fed-batch process that achieved final antibody titers of 0.4g/L. Bispecific antibody cell lines 219R45-MB-21M18AG.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014 and 219R45-MB-21R83AG.129.003 were cultured in 5 L stirred tank bioreactors for 14 - 15 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.138.007 produced a final antibody titer of 1.0 g/L after 14 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.038.009 produced a final antibody titer of 1.6 g/L after 14 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.142.002 produced a final antibody titer of 2.6 g/L after 14 days. Cell line 219R45-MB-21R79AG.072.014 produced a final antibody titer of 2.1 g/L after 15 days. Cell line 219R45-MB-21M18AG.038.009 produced a final antibody titer of 2.4 g/L after 15 days. Culture fluid was harvested by filtration from each of these four cell lines and subjected to Protein A affinity chromatography. The Protein A column was washed with a series of buffers and the antibodies were eluted using a low pH elution buffer. Initial characterization of the purity of the bispecific antibodies was performed using size exclusion chromatography (SEC-HPLC) and isoelectric focusing (IEF).

[0322] Size exclusion chromatography (SEC) was used to determine the purity of the antibody product. SEC is a well known chromatographic method in which molecules (e.g., antibodies) in solution are separated by their size. SEC may be used to distinguish an antibody product from aggregate and/or impurities, and to determine the percentage of the antibody product as compared to the total mixture. As

used herein, SEC does not distinguish between a homomeric antibody and a heterodimeric bispecific antibody.

[0323] Imaged capillary isoelectric focusing (icIEF) was used to determine identity and purity of the bispecific antibody heterodimers. Using icIEF, the charge isoforms of an antibody are separated according to their pI and the result is a "fingerprint" of the antibody's charge distribution. The icIEF method can also serve as a determination of purity by separating the bispecific antibody heterodimers by their distinct pI from any homodimer products or impurities.

[0324] Bispecific antibody samples were analyzed by icIEF on a ProteinSimple ICE280 instrument (ProteinSimple, Santa Clara, CA). For this analysis, a protein mixture is introduced into a capillary, high voltage is applied across the capillary and ampholytes establish a linear pH gradient along the length of the capillary. Under the influence of the electric field, the pI markers and the protein mixture both migrate the length of the capillary until a pH value is reached where the net charge is zero. Once focused, the ICE280 instrument uses whole-column imaging detection with a 280-nm UV camera to monitor the pattern of protein isoforms within the capillary. The resulting electropherogram is calibrated using internal pI markers and integrated to establish the respective percentage areas of the different charged isoforms of the protein mixture. The charge profiles from several anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies are shown in Figure 8. For this experiment, Protein A eluates were diluted with MilliQ water to a concentration of 6.6mg/ml. A total of 18µl of the sample was mixed with 100µL of 8M urea, 70µl of 0.5% methylcellulose, 8µL of 3-10 Pharmalyte, 2µl of high pI marker and 2µl of low pI marker to a final volume of 200µl. Table 6 shows the percentage of antibody product from cell lines 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, and 219R45-MB-21R83AG.129.003 after Protein A affinity chromatography as determined by SEC-HPLC. Table 6 also shows the percentage of heterodimeric antibodies from cell lines 219R45-MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R45-MB-21R83.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014, and 219R45-MB-21R83AG.129.003 after Protein A affinity chromatography as analyzed by icIEF.

Table 6

Cell Line	Antibody Titer (g/L)	Purity by SEC (%)	Purity by IEF (% heterodimer)
219R45-MB-21M18.010.017	3.0	73.9	47.2
219R45-MB-21R79.017.002	0.8	79.3	72.5
219R45-MB-21R75.101	0.4	91.2	84.9
219R45-MB-21R83.113	0.4	91.8	91.4

219R45-MB-21M18.138.007	1.0	92.6	95.8
219R45-MB-21M18AG.038.009	1.6	89.6	89.0
219R45-MB-21M18AG.142.002	2.6	91.2	84.6
219R45-MB-21R79AG.072.014	2.1	87.8	84.9
219R45-MB-21R83AG.129.003	2.4	89.4	90.5

[0325] The purity of the bispecific antibody product can be increased further by additional chromatography steps. After Protein A affinity chromatography, the eluate fraction was held at a low pH for no less than 60 minutes at room temperature for viral inactivation. The antibody solution (Protein A column eluate, pH adjusted) was loaded onto a strong anion-exchange column. Product- and process-related impurities bound to the anion exchange chromatography resin and the flow-through fraction (antibody product) was collected. In some cases, purity was further improved by use of a multi-modal chromatography resin such as ceramic hydroxyapatite. In some cases, buffer exchange of the antibody product was undertaken using ultrafiltration and diafiltration techniques, after which excipients were added. The formulated antibody was sterile filtered into sterile containers and stored refrigerated or frozen. Purity of the bispecific antibodies was re-assessed using SEC-HPLC and IEF.

Table 7

Cell Line	Purity by SEC (%)	Purity by IEF (% heterodimer)
219R45-MB-21M18.010.017	98.9	98.5
219R45-MB-21R79.017.002	95.1	99.3
219R45-MB-21R75.101	97.2	98.2
219R45-MB-21R83.113	95.3	91.4
219R45-MB-21M18.138.007	98.1	100
219R45-MB-21M18AG.142.002	99.6	100
219R45-MB-21R79AG.072.014	98.2	100
219R45-MB-21R83AG.129.003	998.6	100

[0326] As shown in Table 7, the purification of the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodieswith additional chromatography steps after Protein A resulted in isolation of antibody products that were 95% to about 99% pure as analyzed by SEC. Analysis by IEF determined that purified anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21M18.010.017 was 98.5% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R79.017.002 was 99.3% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R75.101 was 98.2% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R83.113

was 91.4% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21M18.138.007 was 100% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21M18AG.142.002 was 100% heterodimeric, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R79AG.072.014 was 100% heterodimeric, and anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody from cell line 219R45-MB-21R83AG.129.003 was 100% heterodimeric. These results demonstrated that the anion-exchange chromatography step greatly increased the percentage of heterodimeric antibodies as compared to purification with Protein A chromatography alone. The addition of a multi-modal chromatography step such as ceramic hydroxyapatite can also improve monomeric purity (as determined by SEP-HPLC).

Example 9

Inhibition of OMP-C8 colon tumor growth *in vivo* tumor recurrence model

[0327] Single cell suspensions of OMP-C8 colon tumor xenografts (20,000 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 6-8 week old NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow for 33 days until they reached an average volume of 240mm^3. The mice were randomized (n = 10 per group) and treated with anti-hDLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, a combination of antibodies 21M18 and bevacizumab, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79, or control antibody, all in combination with irinotecan. Antibodies and irinotecan were dosed weekly by injection into the intraperitoneal cavity. Antibodies 21M18 and bevacizumab were dosed at 7.5mg/kg, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 were dosed at 15mg/kg, and irinotecan was dosed at 45mg/kg. Irinotecan was dosed for four weeks, at which time, it was discontinued and the administration of the antibodies continued. Tumor growth was monitored and tumor volumes were measured with electronic calipers at the indicated time points. Data are expressed as mean ± S.E.M.

[0328] As shown in Figure 9, anti-hDLL4 antibody 21M18 continued to inhibit tumor growth after treatment with irinotecan was stopped. In contrast, anti-VEGF antibody bevacizumab was not able to inhibit regrowth of the tumor after irinotecan had been stopped. The combination of anti-DLL4 antibody 21M18 and anti-VEGF antibody bevacizumab resulted in greater inhibition of tumor regrowth than either agent alone. Furthermore, the anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18 was more effective at inhibiting tumor regrowth than the mixture of the two antibodies.

Example 10

Reduction in tumorigenicity of OMP-C8 colon tumors

[0329] Single cell suspensions of OMP-C8 colon tumor xenografts (20,000 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 6-8 week old NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow for 33

days until they reached an average volume of 300mm^3. The mice were randomized (n = 5 per group) and treated with anti-DLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, a combination of antibodies 21M18 and bevacizumab, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21M18, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibody 219R45-MB-21R79, or control antibody, either in combination with irinotecan or without irinotecan. Antibodies and irinotecan were dosed weekly by injection into the intraperitoneal cavity. Antibodies 21M18 and bevacizumab were dosed at 7.5mg/kg, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79 were dosed at 15mg/kg, and irinotecan was dosed at 45mg/kg. Tumors were harvested after 4 weeks, processed into single cell suspensions, and the human tumor cells were isolated. 150 tumor cells from each experimental group were injected subcutaneously into a new cohort of mice (n = 10 per group) and tumors were allowed to grow without treatment. Tumor growth was monitored and tumor volumes were measured with electronic calipers.

[0330] Individual tumor volumes at day 68 are shown in Figure 10. Anti-DLL4 antibody 21M18, the combination of 21M18 with anti-VEGF antibody bevacizumab, bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R79, and irinotecan all reduced tumor growth frequency as single agents. In contrast, anti-VEGF bevacizumab as a single agent had no effect on tumor growth frequency as compared to the control antibody. In the groups treated with a combination of irinotecan and antibodies, the bispecific antibody 219R45-MB-21M18 had the greatest effect in reducing tumor growth frequency.

Example 11

Inhibition of OMP-C8 colon tumor growth *in vivo*

[0331] Single cell suspensions of OMP-C8 colon tumor xenografts (50,000 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 6-8 week old NOD/SCID mice. Tumors were allowed to grow for 21 days until they reached an average volume of 80mm^3. The mice were randomized (n = 8 per group) and treated with anti-DLL4 antibody 21M18, anti-VEGF antibody bevacizumab, anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R83, or control antibody, either alone or in combination with irinotecan. Antibodies and irinotecan were dosed weekly by injection into the intraperitoneal cavity. Bevacizumab and bispecific antibodies 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, and 219R45-MB-21R83 were dosed at 15mg/kg, and irinotecan was dosed at 7.5mg/kg. Tumor growth was monitored and tumor volumes were measured with electronic calipers at the indicated time points. Data are expressed as mean ± S.E.M.

[0332] As single agents, all four anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies showed enhanced anti-tumor activity relative to anti-VEGF antibody bevacizumab. In combination with irinotecan, treatment with anti-VEGF/anti-DLL4 bispecific antibodies 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R83 resulted in the greatest inhibition of tumor growth (Figure 11).

[0333] Following the treatment phase, tumor sections were prepared and analyzed by hematoxylin and eosin (H&E) staining. The tumors treated with 219R45-MB-21M18 and 219R45-MB-21R83 in combination with irinotecan showed dark pink staining regions providing evidence of extensive calcification. This is characteristic of highly necrotic tumor tissue.

Example 12

Non-GLP toxicity study of bispecific antibodies in cynomolgus monkeys

A non-GLP toxicity study in cynomolgus monkeys was initiated to evaluate and compare the toxicity profile of some of the bispecific antibodies. The animals were dosed with 0 mg/kg (control), 5 mg/kg (low dose), or 30 mg/kg (high dose) of anti-DLL4/anti-VEGF bispecific antibody (219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R83, or 219R45-MB-21R79) every 2 weeks via IV infusion. 3 males and 3 females were dosed in each group. After 15 weeks, mean body weights were lower in animals receiving the high dose of 219R45-MB-21R79 than in animals that received the high dose of either 219R45-MB-21R18 or 219R45-MB-21R83. In addition, mean serum albumin levels were lower in animals that received 219R45-MB-21R79 than in those that received either 219R45-MB-21R18 or 219R45-MB-21R83. Although preliminary in nature, these early data suggest that 219R45-MB-21R18 and 219R45-MB-21R83 may have a superior toxicity profile compared to 219R45-MB-21R79.

[0334] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application.

[0335] All publications, patents, patent applications, internet sites, and accession numbers/database sequences including both polynucleotide and polypeptide sequences cited herein are hereby incorporated by reference herein in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent, patent application, internet site, or accession number/database sequence was specifically and individually indicated to be so incorporated by reference.

SEQUENCES

21M18 Heavy chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:1)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R79 Heavy chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:2)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R45 Heavy chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:3)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Light chain with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:4)
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWF
QQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPW
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

21M18 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:5)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R79 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:6)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV

VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R45 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:7)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Light chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:8)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

21M18 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:9)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

21R79 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:10)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

219R45 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:11)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVSS

Light chain variable region (SEQ ID NO:12)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

21R75, 21R79, 21R83, and 21M18 Heavy chain CDR1 (SEQ ID NO:13)
TAYYIH

Alternative 21R75, 21R79, 21R83, and 21M18 Heavy chain CDR1 (SEQ ID NO:79)
AYYIH

21R79 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:14)
YIANYNRATNYNQKFKG

21M18 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:15)
YISSYNGATNYNQKFKG

21R75, 21R79, 21R83, and 21M18 Heavy chain CDR3 (SEQ ID NO:16)
RDYDYDVGMDY

219R45 Heavy chain CDR1 (SEQ ID NO:17)
NYWMH

219R45 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:18)
DINPSNGRTSYKEKFKR

219R45 Heavy chain CDR3 (SEQ ID NO:19)
HYDDKYYPLMDY

Light chain CDR1 (SEQ ID NO:20)
RASESVDNYGISFMK

Light chain CDR2 (SEQ ID NO:21)
AASNQGS

Light chain CDR3 (SEQ ID NO:22)
QQSKEVPWTFGG

Human DLL4 with signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:23)
MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
GDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL
CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCE
HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR
GPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS
IDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVG

Human DLL4 without predicted signal sequence (SEQ ID NO:24)
SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL
SCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCST
PWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELS
ECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANY
ACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCAR
NPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVC
NCPYGFVGSRCEFPVG

Human DLL4 N-Terminal Region (SEQ ID NO:25)
SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQN

Human DLL4 DSL Domain (SEQ ID NO:26)
WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG
EYC

Human VEGF-A with signal sequence (underlined)(SEQ ID NO:27)
MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVD
IFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPG
PHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

Human VEGF-A without predicted signal sequence (SEQ ID NO:28)

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGC
CNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRG
KGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSC
KNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

21M18 Heavy chain nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:29)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC
TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
TCTCCTGGCAAGTAG

21R79 Heavy chain nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:30)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCACCA
GGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCCGCCTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC
TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC

TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
TCTCCTGGCAAGTAG

21R79 Heavy chain nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:31)
ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

219R45 Heavy chain nucleotide sequence (13A Version 1) (SEQ ID NO:32)
ATGAAGCATCTGTGGTTTTTCCTGTTGCTCGTGGCGGCACCCAGATGGGTGTTGTCCCAA
GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTATCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCTCCG
GGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATATAAG
GAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTACATG
GAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTATGAT
GACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCCAGC
GCGTCGACGAAAGGTCCCTCGGTATTTCCCCTCGCCCCCTGCTCGAGGTCGACATCCGAA
TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCGGTAACGGTGTCG
TGGAACTCGGGAGCGCTTACGTCCGGAGTCCACACATTTCCGGCGGTACTGCAATCCTCG
GGACTGTATTCGTTGTCGTCAGTGGTGACTGTCCCGTCCTCCAATTTCGGGACTCAGACC
TATACGTGCAACGTCGACCACAAACCCTCAAACACCAAGGTGGATAAGACAGTGGAGCGC
AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCGTGTCCGGCACCCCCTGTCGCCGGACCCTCAGTCTTT
TTGTTTCCGCCGAAGCCCAAAGATACACTCATGATCTCAAGAACGCCCGAGGTAACATGC
GTGGTGGTCGATGTAAGCCACGAGGATCCAGAAGTACAATTCAATTGGTATGTAGACGGG
GTCGAGGTCCATAACGCAAAGACGAAACCGAGGGAAGAGCAGTTCAATTCGACTTTCCGG
GTGGTGTCGGTGCTTACAGTCGTACATCAGGACTGGTTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGT
AAAGTATCGAATAAGGGCCTTCCAGCGCCGATTGAAAAGACCATCTCCAAGACCAAAGGA
CAGCCACGAGAGCCGCAAGTCTATACGCTTCCTCCCAGCCGAGAAAAGATGACTAAAAAC
CAGGTATCGCTTACGTGTCTCGTCAAGGGTTTCTACCCTTCGGACATCGCGGTGGAATGG
GAGAGCAATGGACAACCGGAAAACAACTACAAGACGACACCGCCTATGTTGAAAAGCGAT
GGATCGTTTTTCCTCTATTCGAAACTCACGGTCGATAAGTCACGGTGGCAGCAGGGGAAT
GTGTTCTCCTGTTCAGTGATGCACGAGGCGCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG
TCACTTTCCCCGGGAAAATGA

219R45 Heavy chain nucleotide sequence (13A Version 2) (SEQ ID NO:33)
ATGAAGCACCTCTGGTTCTTCCTGCTCCTCGTGGCTGCTCCTCGGTGGGTCCTCTCCCAA
GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTCTCC
TGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCT
GGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTACAAG
GAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTACATG
GAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTACGAC
GACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
GCTTCCACAAAAGGACCCTCCGTCTTTCCCCTCGCCCCCTGCTCCCGGTCCACATCCGAA
TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCTGTCACAGTGTCC
TGGAACTCCGGAGCTCTCACATCCGGAGTCCACACATTTCCTGCTGTGCTCCAATCCTCC
GGACTGTATTCCCTCTCCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCAATTTCGGGACACAGACC
TATACATGCAACGTGGACCACAAACCCTCCAACACCAAAGTCGATAAGACAGTGGAGCGC
AAGTGCTGCGTGGAGTGTCCCCCTTGTCCTGCTCCCCCTGTGGCTGGACCTTCCGTCTTT
CTGTTTCCTCCTAAACCTAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGC
GTGGTCGTCGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCCAATTTAATTGGTATGTGGACGGG
GTGGAGGTCCATAACGCTAAGACCAAACCTAGGGAAGAGCAGTTCAATTCCACTTTCCGG
GTGGTGTCCGTGCTGACCGTCGTTCATCAGGACTGGCTCAACGGGAAAGAATACAAATGC
AAAGTCTCTAATAAGGGCCTCCCTGCTCCTATTGAAAAAACAATTTCCAAAACAAAAGGA
CAACCTCGGGAGCCTCAAGTCTACACACTGCCACCTTCCCGGGAAAAAATGACAAAAAAT
CAAGTCTCCCTCACATGTCTCGTCAAGGGATTCTACCCTTCCGACATTGCTGTGGAATGG
GAATCCAATGGACAACCTGAAAACAACTACAAGACAACACCTCCTATGCTCAAAAGCGAT
GGGTCCTTTTTCCTCTATTCCAAACTCACAGTCGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGGAAT
GTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAATCACTATACCCAGAAAAGCCTG
TCCCTCTCCCCTGGAAAATGA

Light chain nucleotide sequence (SEQ ID NO:34)
ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTC
ATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTCGTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC
GGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC
TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG
ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGTTAG

21M18 Heavy chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:35)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCT

21R79 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B) (SEQ ID NO:36)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCA
CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACTACAACCGGGCCACCAACTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTAC

ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCTCC

21R79 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:37)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

219R45 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13A version 1) (SEQ ID NO:38)
CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTA
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCT
CCGGGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATAT
AAGGAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTAC
ATGGAACTTTCGTCGCTGAGGTCGGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTAT
GATGACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGTCAGGGTACGTTGGTCACCGTCTCC
AGC

219R45 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13A Version 2) (SEQ ID NO:39)
CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTC
TCCTGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCT
CCTGGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTAC
AAGGAAAAATTCAAACGGCGGGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTAC
ATGGAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTAC
GACGACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCC
AGC

Light chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:40)
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

Human IgG1 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:41)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG2 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:42)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG3 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:43)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE
ALHNRFTQKSLSLSPGK

Human IgG4 Heavy chain constant region (SEQ ID NO:44)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FLAG peptide (SEQ ID NO:45)
DYKDDDDK

Parental 21R79 Heavy chain with signal sequence underlined unmodified chain (SEQ ID NO:46)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 219R45 Heavy chain with signal sequence underlined (SEQ ID NO:47)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMGDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 21R79 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:48)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 219R45 Heavy chain without signal sequence (SEQ ID NO:49)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Parental 21R79 Heavy chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:50)
CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATC
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCG
CCAGGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTAT
AACCAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTAC
ATGGAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTAC
GACTATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCC

Parental 219R45 Heavy chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:51)
CAGGTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTC
AGCTGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTAT
AAGGAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTAC
ATGGAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTAT
GACGATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGC
AGC

Parental 21R79 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (SEQ ID NO:52)
ATGAAACACTTGTGGTTTTTCCTCTTGCTCGTGGCAGCTCCTCGGTGGGTACTTTCACAA
GTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATCTCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCGCCA
GGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTATAAC
CAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCACAACGGATACATCGACATCGACGGCCTACATG
GAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTACGAC
TATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCCGCCAGC
ACCAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGT
TGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAA

Parental 219R45 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (SEQ ID NO:53)
ATGAAACACCTCTGGTTCTTTTTGCTCCTGGTGGCAGCTCCCCGATGGGTGCTTAGCCAG
GTACAGCTCGTGCAATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCGGTAAAGGTCAGC
TGCAAAGCGTCAGGTTATACATTCACGAATTACTGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCT
GGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTATAAG

GAGAAGTTTAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTACATG
GAGTTGTCATCCCTGCGGTCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTATGAC
GATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGCAGC
GCGTCCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

Parental 21R79 and 219R45 light chain variable region nucleotide sequence (SEQ ID NO:54)
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC
GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG
ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Parental 21R79 and 219R45 light chain nucleotide sequence (SEQ ID NO:55)
ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGG
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC
GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG
ACATTCGGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCCCTCCGTCTTC
ATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAAAGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCCGGGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAAGC
GGCAACTCCCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTTGA

21R75 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:56)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R75 Heavy chain with predicted signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:57)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIAGYKDATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R75 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:58)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

21R75 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:59)
YIAGYKDATNYNQKFKG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:60)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (13B Version 1T) (SEQ ID NO:77)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence (13B Version S1-2) (SEQ ID NO:61)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAG

21R83 Heavy chain without predicted signal sequence (SEQ ID NO:62)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R83 Heavy chain with predicted signal sequence (underlined) (SEQ ID NO:63)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISNYNRATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21R83 Heavy chain variable region (SEQ ID NO:64)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS

21R83 Heavy chain CDR2 (SEQ ID NO:65)
YISNYNRATNYNQKFKG

21R83 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 1) (SEQ ID NO:66)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R83 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 1T) (SEQ ID NO:78)
ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC
ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC
TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC

TGCGTGGAATGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version S1-2) (SEQ ID NO:67)

<u>ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCC</u>CAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAG

21R75 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:68)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTCACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT

21R75 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:69)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

21R83 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 1) (SEQ ID NO:70)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACTACAACCGGGCCACCAATTAC
AACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

21R75 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:71)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTAT
AACCAAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

21R83 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 2) (SEQ ID NO:72)
ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

21R83 Heavy chain variable region nucleotide sequence (13B Version 2) (SEQ ID NO:73)
CAGGTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
AACCAAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

21R75 Heavy chain nucleotide sequence with signal sequence underlined (13B Version 2) (SEQ ID NO:74)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

21M18 Heavy chain nucleotide sequence (version 2) (SEQ ID NO:75)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

21M18 Heavy chain variable region (version 2) (SEQ ID NO:76)

CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGTTGC
AAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCAGGA
CAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAACCAA
AAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATGGAA
TTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGATTAT
GATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Anti-DLL4 heavy chain CDR2 consensus sequence (SEQ ID NO:80):
$YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$, where X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine, or aspartic acid

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

3. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

4. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

5. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

6. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
(a) a heavy chain consisting essentially of SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:7; and
(b) a light chain consisting essentially of SEQ ID NO:8.

7. The antibody according to any one of claims 1-6, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

8. The antibody of claim 7, wherein the VEGF receptor is VEGFR-1 or VEGFR-2.

9. The antibody according to any one of claims 1-8, which modulates angiogenesis.

10. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

11. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

13. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

14. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(b) a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

15. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain consisting essentially of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, or SEQ ID NO:62; and
(b) a light chain consisting essentially of SEQ ID NO:8.

16. The antibody according to any one of claims 10-15, which inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor.

17. The antibody of claim 16, wherein the Notch receptor is selected from the group consisting of Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4.

18. The antibody according to any one of claims 10-17, which inhibits Notch signaling.

19. The antibody according to any one of claims 10-18, which is a monoclonal antibody.

20. The antibody according to any one of claims 10-19, which is a recombinant antibody.

21. The antibody according to any one of claims 1-20, which is a chimeric antibody.

22. The antibody according to any one of claims 1-21, which is a humanized antibody.

23. The antibody according to any one of claims 1-19, which is a human antibody.

24. The antibody according to any one of claims 1-23, which is a bispecific antibody.

25. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an IgG1 antibody.

26. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an IgG2 antibody.

27. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an antibody fragment comprising an antigen-binding site.

28. A bispecific antibody comprising:
a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and

b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4,
wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19);
wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

29. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14).

30. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15).

31. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59).

32. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YISNYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65).

33. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, which comprises:
(a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11;
(b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

34. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

35. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

36. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

37. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

38. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:9; and

(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

39. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:10; and

(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

40. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;
(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:58; and
(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

41. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;
(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:64; and
(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

42. The bispecific antibody according to any one of claims 28-41, which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers.

43. The bispecific antibody of claim 42, wherein the first and second CH3 domains are modified based upon electrostatic effects.

44. The bispecific antibody according to any one of claims 28-43, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine.

45. The bispecific antibody according to any one of claims 28-43, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate.

46. The bispecific antibody of claim 42, wherein the first and second CH3 domains are modified using a knobs-into-holes technique.

47. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:5, and two light chains of SEQ ID NO:8.

48. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:6, and two light chains of SEQ ID NO:8.

49. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:56, and two light chains of SEQ ID NO:8.

50. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:62, and two light chains of SEQ ID NO:8.

51. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an N-terminal fragment of human DLL4 (amino acids 1-191 of SEQ ID NO:24).

52. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25.

53. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

54. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25 and amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

55. The bispecific antibody according to any one of claims 28-46, wherein the first antigen-binding site binds human VEGF with a K_D of about 100nM or less and the second antigen-binding site binds human DLL4 with a K_D of about 100nM or less.

56. A bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

57. The bispecific antibody according to any one of claims 28-56, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

58. The bispecific antibody of claim 57, wherein the VEGF receptor is VEGFR-1 or VEGFR-2.

59. The bispecific antibody according to any one of claims 28-58, which inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor.

60. The bispecific antibody of claim 59, wherein the Notch receptor is selected from the group consisting of Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4.

61. The bispecific antibody according to any one of claims 28-60, which inhibits Notch signaling.

62. The bispecific antibody according to any one of claims 28-61, which modulates angiogenesis.

63. A polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

64. A cell comprising the antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

65. A cell producing the antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

66. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide that encodes an antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

67. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78.

68. A vector comprising the polynucleotide of claim 66 or claim 67.

69. A cell comprising the polynucleotide of claim 66 or claim 67 or the vector of claim 68.

70. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 1-62 and a pharmaceutically acceptable carrier.

71. A method of modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

72. A method of inhibiting growth of a tumor, wherein the method comprises contacting the tumor with an effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

73. A method of inhibiting growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

74. A method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

75. The method according to any one of claims 72-74, wherein the tumor is selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, ovarian tumor, pancreatic tumor, lung tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor.

76. A method of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

77. The method of claim 76, wherein the cancer is selected from the group consisting of colorectal cancer, colon cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, head and neck cancer, lymphoma and leukemia.

78. The method according to any one of claims 71-77, which further comprises administering a second therapeutic agent.

79. The method of claim 78, wherein the second therapeutic agent is a chemotherapeutic agent.

80. The method of claim 78, wherein the second therapeutic agent is a second antibody.

81. The method according to any one of claims 71 or 73-80, wherein the subject is human.

82. A method for the production of a bispecific antibody, comprising expressing at least one polynucleotide of claim 66 or claim 67 in a cell.

83. The method of claim 82, wherein the cell is a prokaryotic cell or a eukaryotic cell.

84. The method of claim 82 or claim 83, further comprising isolating the bispecific antibody from the cell or the cell culture supernatant.

85. An antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

86. The antibody of claim 85 which is a bispecific antibody and further comprises a second antigen-binding site, wherein the second antigen-binding site specifically binds human VEGF and comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19) ; and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

87. A bispecific antibody comprising (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1nM and about 1.0 nM and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM.

88. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 85-87 and a pharmaceutically acceptable carrier.

89. A method of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody according to any one of claims 85-87.

AMENDED CLAIMS
received by the International Bureau on 26 April 2013 (26.04.2013)

What is claimed is:

1. A bispecific antibody comprising:

a) a first antigen-binding site that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), and

b) a second antigen-binding site that specifically binds human delta-like 4 ligand (DLL4),

wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19);

wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glycine, arginine, or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and

wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. The bispecific antibody of claim 1, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16).

3. The bispecific antibody of claim 1 or claim 2, which comprises:

(a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and

(c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

4. The bispecific antibody of any one of claims 1-3, which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers.

5. The bispecific antibody of any one of claims 1-4, wherein the first and second CH3 domains are modified based upon electrostatic effects.

6. The bispecific antibody of any one of claims 1-5, which is a monoclonal antibody, a recombinant antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an IgG1 antibody, or an IgG2 antibody.

7. The bispecific antibody of any one of claims 1-5, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions corresponding to positions 249 and 288 of SEQ ID NO:42, wherein the amino acids are replaced with glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions corresponding to positions 236 and 278 of SEQ ID NO:42, wherein the amino acids are replaced with lysine.

8. The bispecific antibody of any one of claims 1-7, which:
   (i) inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor;
   (ii) inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor;
   (iii) inhibits Notch signaling; and/or
   (iv) modulates angiogenesis.

9. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising:
   (a) a heavy chain of SEQ ID NO:7;
   (b) a heavy chain of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:56, or SEQ ID NO:62; and
   (c) two light chains of SEQ ID NO:8.

10. A bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

11. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
   (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and

(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. The antibody of claim 11, which comprises:

(a) a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and

(b) a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

13. The antibody of claim 11, which comprises:

(a) a heavy chain comprising SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:7; and

(b) a light chain comprising SEQ ID NO:8.

14. The antibody of any one of claims 11-13, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

15. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:

(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glycine, arginine, or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and

(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

16. The antibody of claim 15, which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16).

17. The antibody of claim 15 or claim 16, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and

(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

18. The antibody of any one of claims 11-17, which is a monoclonal antibody, a recombinant antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, a bispecific antibody, an IgG1 antibody, an IgG2 antibody, or an antibody fragment comprising an antigen-binding site.

19. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1-18 and a pharmaceutically acceptable carrier.

20. A cell comprising or producing the antibody of any one of claims 1-18.

21. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide that encodes the antibody of any one of claims 1-18.

22. A vector comprising the polynucleotide of claim 21.

23. A cell comprising the polynucleotide of claim 22.

24. A polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

25. Use of the antibody of any one of claims 1-18 in the manufacture of a medicament for treatment of cancer.

26. The use of the antibody of claim 25, wherein the cancer is selected from the group consisting of colorectal cancer, colon cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, head and neck cancer, lymphoma and leukemia.

27. Use of the antibody of any one of claims 1-18 in the manufacture of a medicament for inhibiting growth of a tumor.

28. The use of the antibody of claim 27, wherein the tumor is selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, ovarian tumor, pancreatic tumor, lung tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor.

29. The use of the antibody of any one of claims 25-28, wherein the use comprises the antibody and at least one additional therapeutic agent.

30. A method for the production of an antibody, comprising expressing at least one polynucleotide of claim 21 in a cell.

Figure 1A

Bispecific Antibody	Anti-VEGF binding region			Anti-DLL4 binding region		
	Heavy Chain			Heavy Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
219R45-MB-21M18	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R79	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R75	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R83	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)

Bispecific Antibody	Anti-VEGF and Anti-DLL4 binding regions		
	Light Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3
219R45-MB-21M18	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R79	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R75	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R83	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

Figure 1B

Bispecific Antibody	Anti-VEGF binding region		Anti-DLL4 binding region	
	Heavy Chain Variable Region	Light Chain Variable Region	Heavy Chain Variable Region	Light Chain Variable Region
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:12

Figure 1C

Bispecific Antibody	Anti-VEGF binding region		Anti-DLL4 binding region	
	Heavy Chain	Light Chain	Heavy Chain	Light Chain
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:57 SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:63 SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8

Figure 2

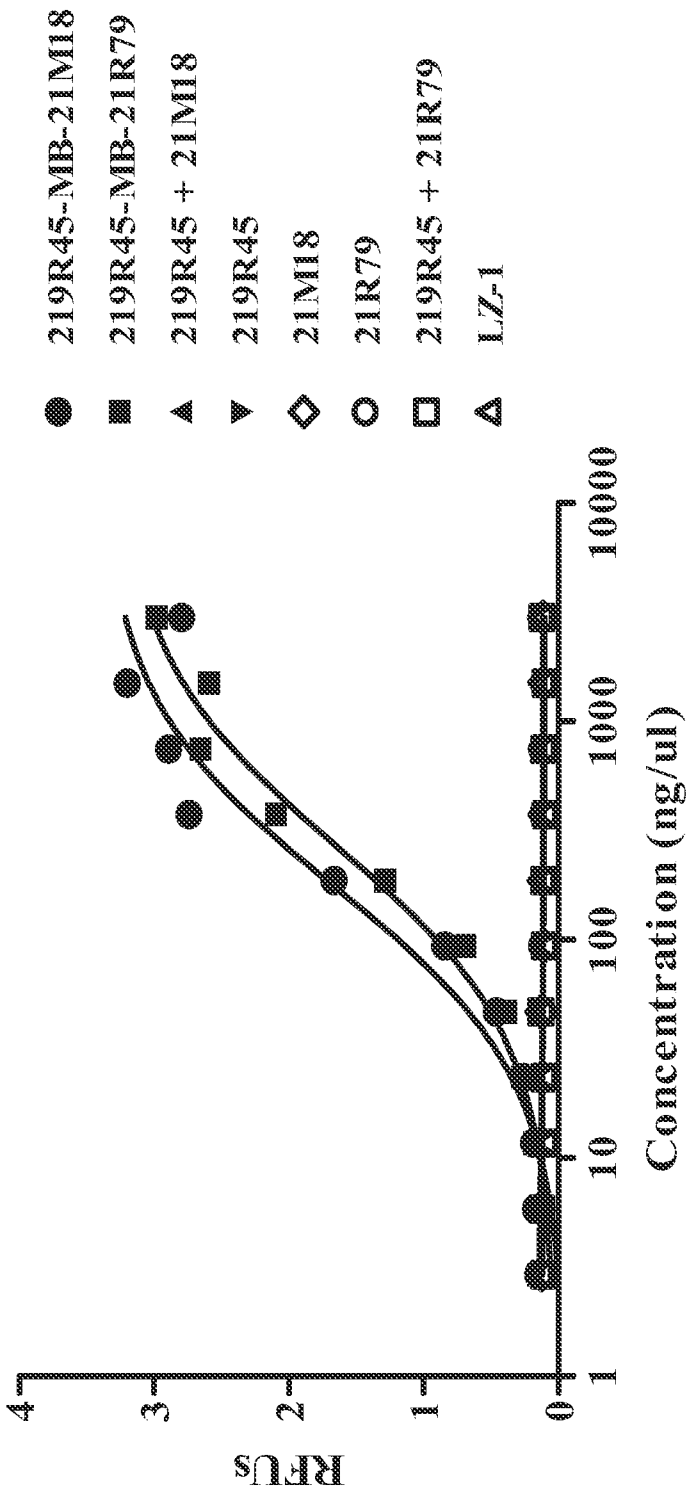

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
219R45 + 21M18
219R45
21M18
21R79
219R45 + 21R79
LZ-1
RFUs
0
1
2
3
4
1
10
100
1000
10000
Concentration (mg/ul)

Figure 3

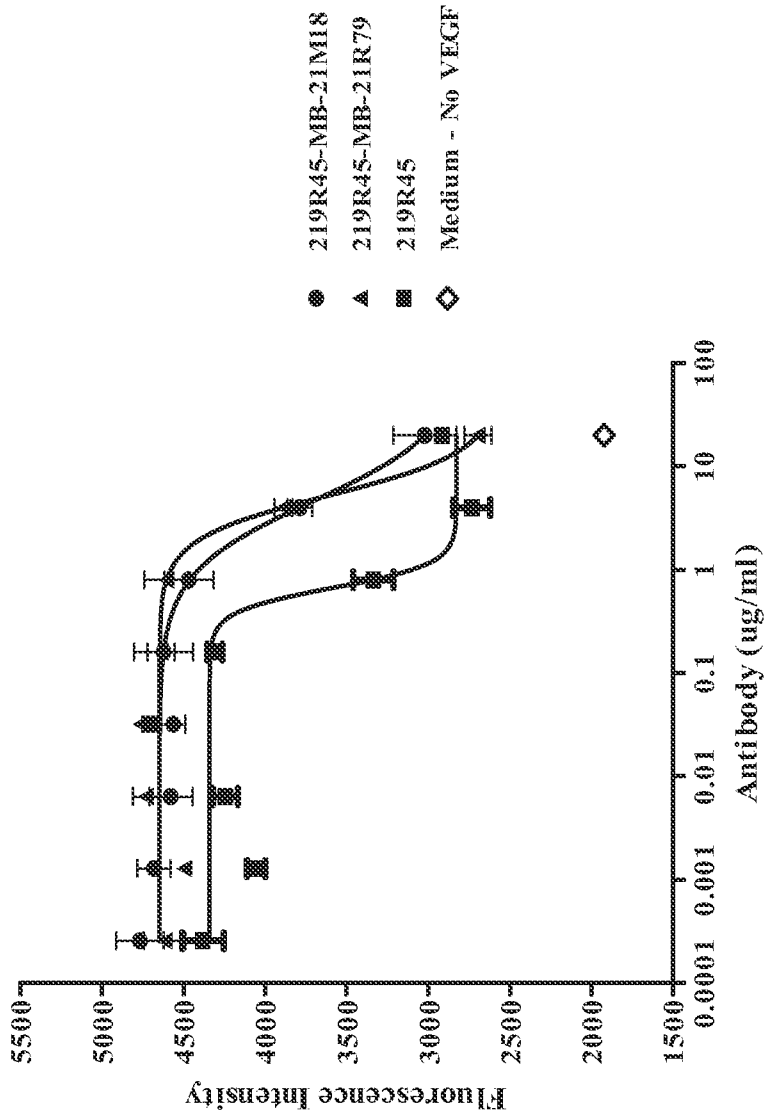

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
219R45
Medium - No VEGF
Fluorescence Intensity
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Antibody (ug/ml)

Figure 4

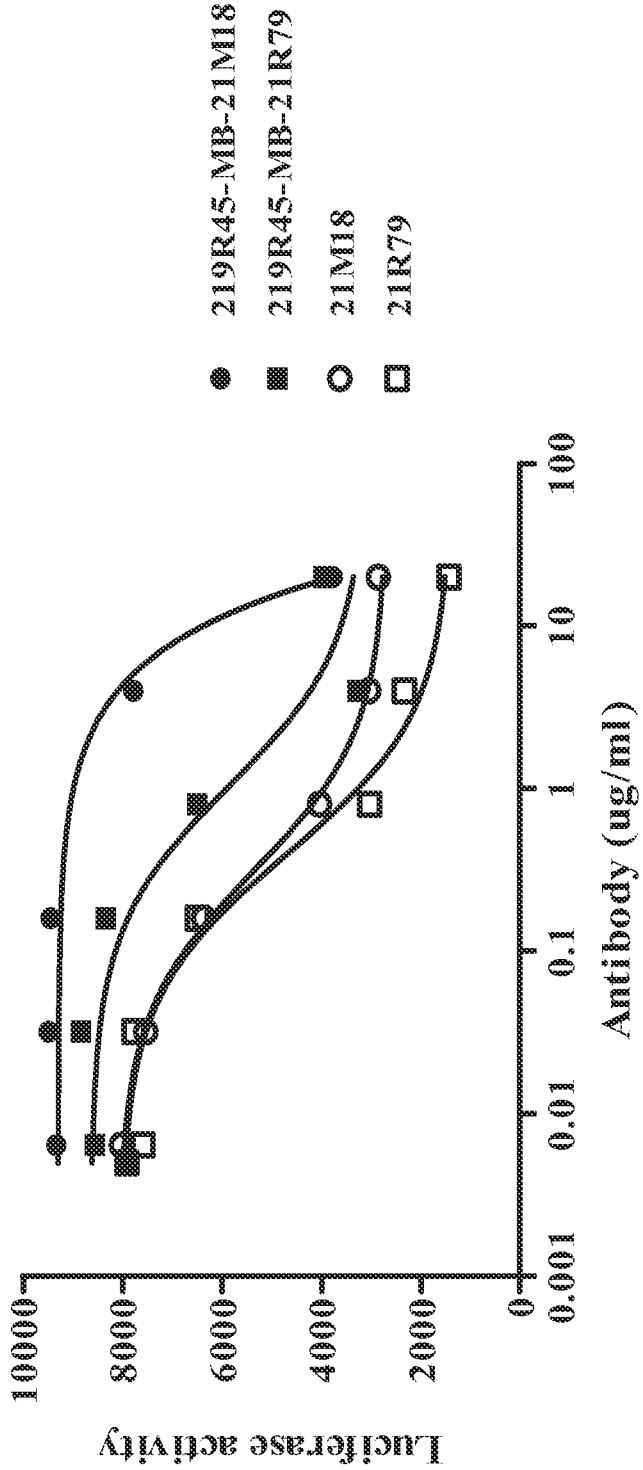

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
21M18
21R79
Luciferase activity
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.0001
0.01
0.1
1
10
100
Antibody (ug/ml)

Figure 5

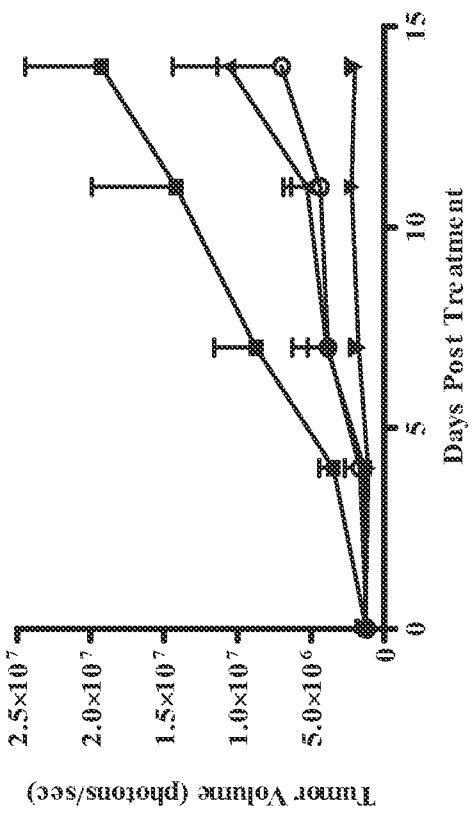

C8 – Skin graft Model
Tumor Volume (photons/sec)
2.5×10^7
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
5
10
15
Days Post Treatment
Control Ab
Anti-hDLL4 Ab - 21M18
Anti-VEGF Ab - bevacizumab
Anti-VEGF/DLL4 Bispecific - 219R45-MB-21M18

Figure 6

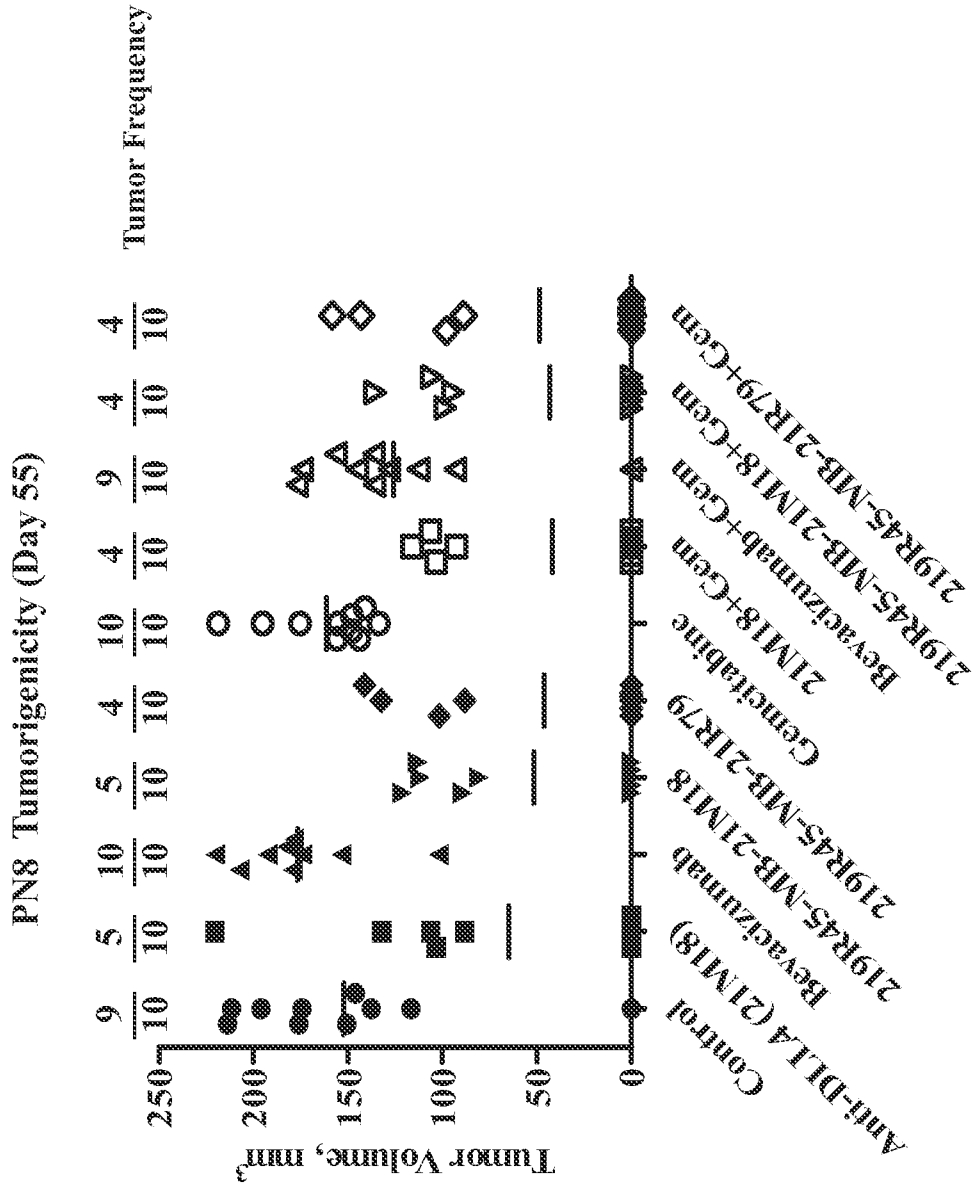

PN8 Tumorigenicity (Day 55)
Tumor Volume, mm3
250
200
150
100
50
0
Tumor Frequency
9/10
5/10
10/10
5/10
4/10
10/10
4/10
10/10
9/10
4/10
4/10
10/10
Control
Anti-DLL4 (21M18)
Bevacizumab
21R45-MB-21M18
21R45-MB-21R79
Gemcitabine
21M18+Gem
Bevacizumab+Gem
21R45-MB-21M18+Gem
21R45-MB-21R79+Gem

Figure 7

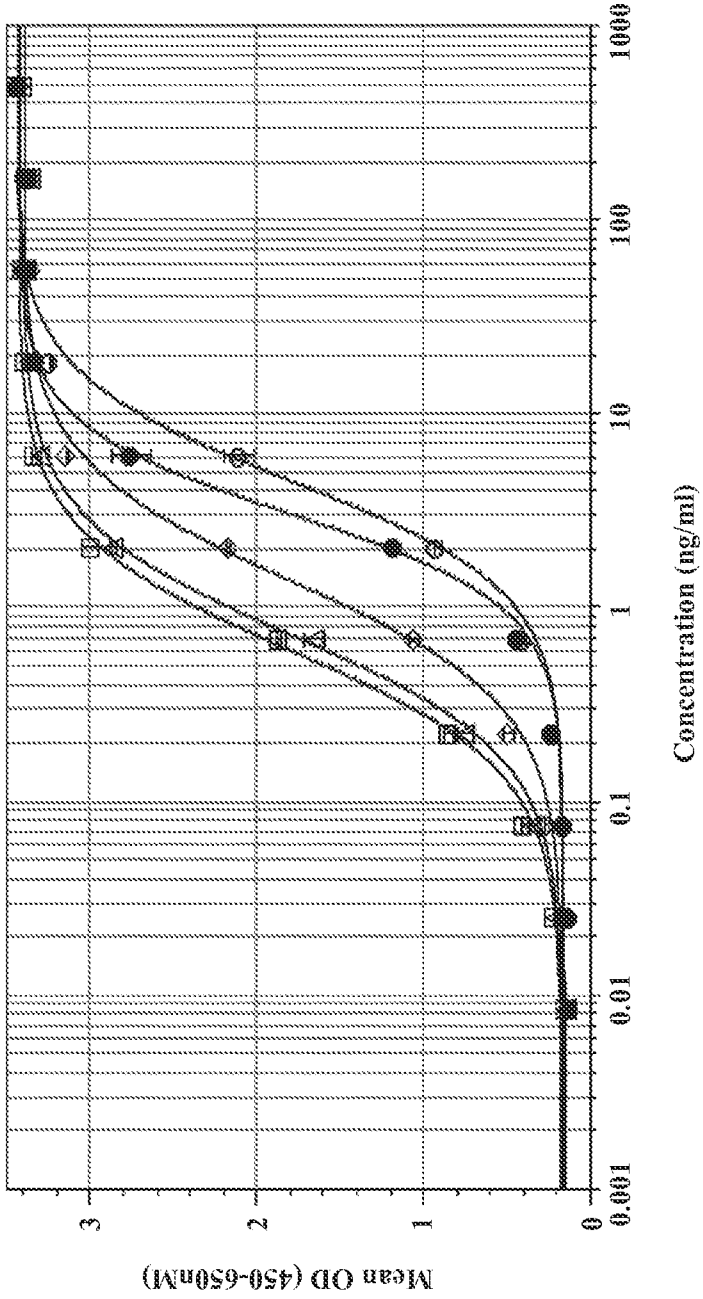

Mean OD (450-650nM)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration (ng/ml)

Figure 8

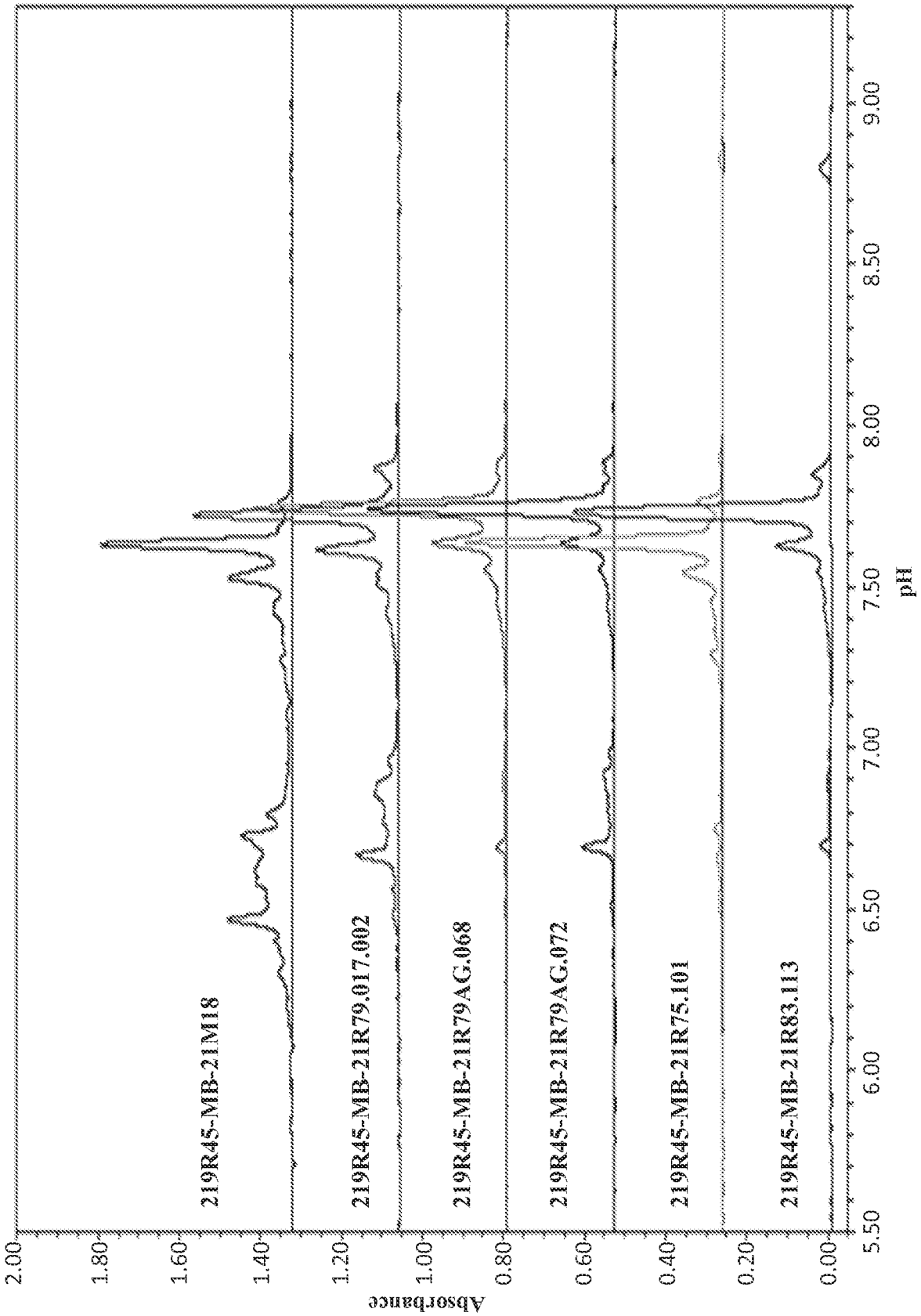

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79.017.002
219R45-MB-21R79AG.068
219R45-MB-21R79AG.072
219R45-MB-21R75.101
219R45-MB-21R83.113
Absorbance
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
pH

Figure 9

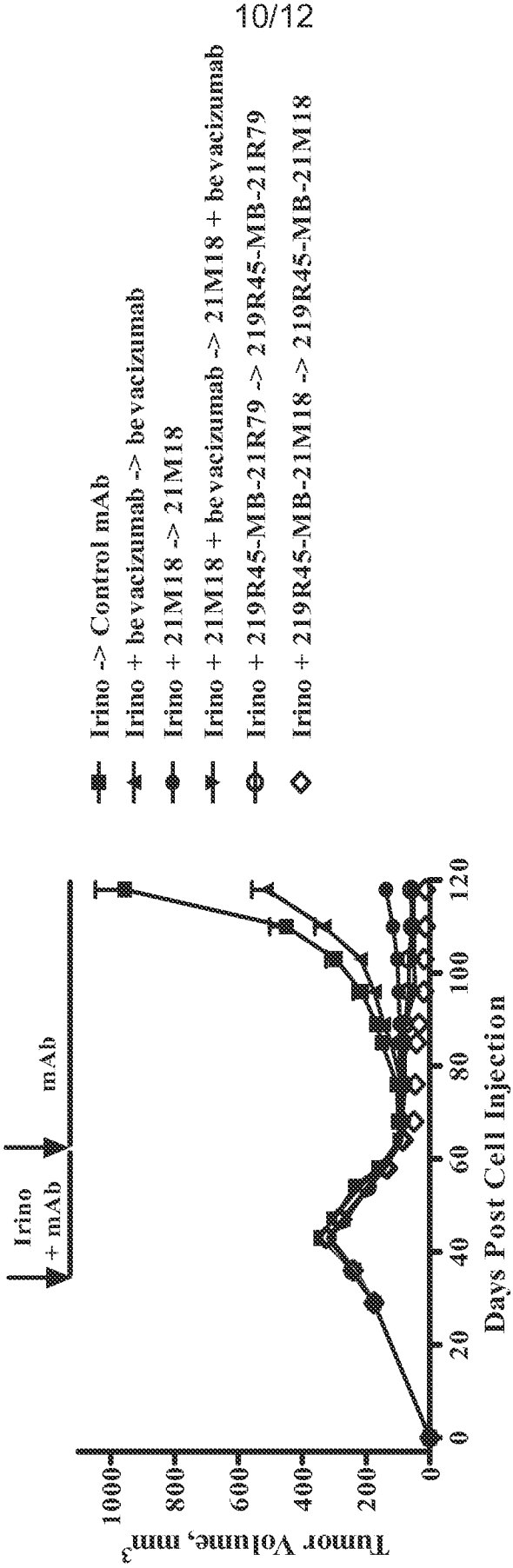

Irino + mAb
mAb
Irino -> Control mAb
Irino + bevacizumab -> bevacizumab
Irino + 21M18 -> 21M18
Irino + 21M18 + bevacizumab -> 21M18 + bevacizumab
Irino + 219R45-MB-21R79 -> 219R45-MB-21R79
Irino + 219R45-MB-21M18 -> 219R45-MB-21M18
Tumor Volume, mm3
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
Days Post Cell Injection

Figure 10

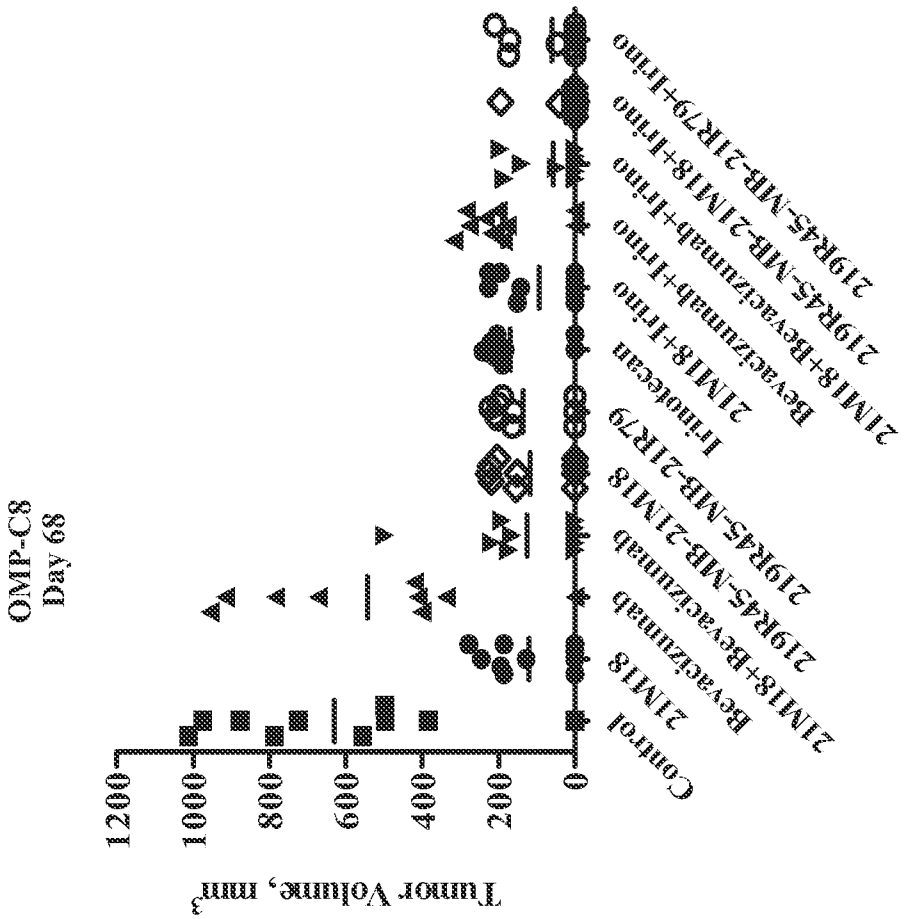
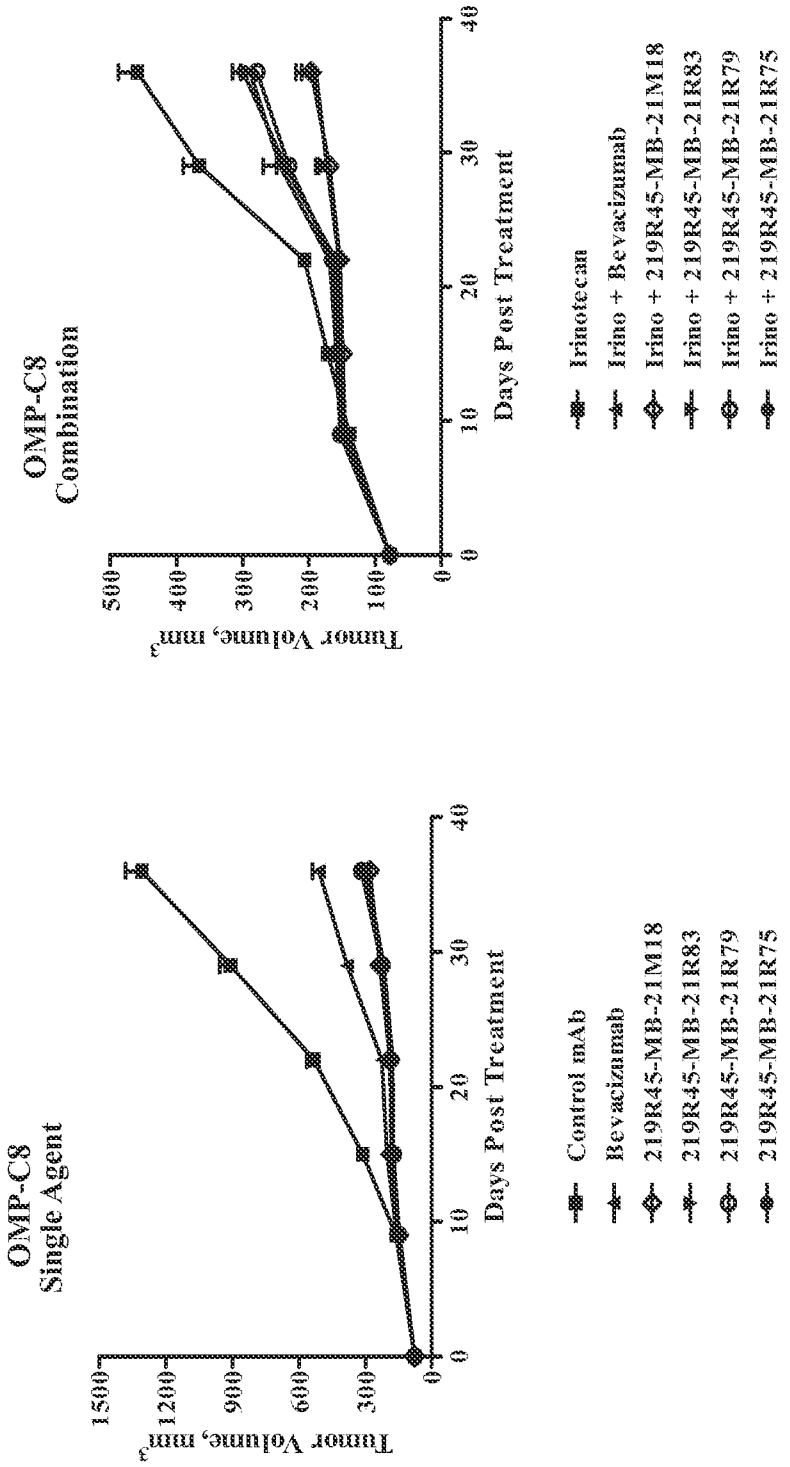

OMP-C8
Day 68
Tumor Volume, mm3
1200
1000
800
600
400
200
0
Control
21M18
Bevacizumab
21M18+Bevacizumab
21R45-MB-21M18
21R45-MB-21R79
Irinotecan
21M18+Irino
Bevacizumab+Irino
21M18+Bevacizumab+Irino
21R45-MB-21M18+Irino
21R45-MB-21R79+Irino

Figure 11


OMP-C8
Single Agent
Tumor Volume, mm3
1500
1200
900
600
300
0
0
10
20
30
40
Days Post Treatment
OMP-C8
Combination
Tumor Volume, mm3
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Days Post Treatment
Control mAb
Bevacizumab
219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R83
219R45-MB-21R79
219R45-MB-21R75
Irinotecan
Irino + Bevacizumab
Irino + 219R45-MB-21M18
Irino + 219R45-MB-21R83
Irino + 219R45-MB-21R79
Irino + 219R45-MB-21R75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/56886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 (2012.01)
USPC - 424/136.1
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)
USPC: 424/136.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 530/387.3, 530/389.2, 536/23.53, 536/23.1 (keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), PatBase, Google Patents/Scholar
Search Terms Used: VEGF antibody, NYWMH, DINPSNGRTSYKEKFKR, HYDDKYYPLMDY, RASESVDNYGISFMK, AASNQGS, QQSKEVPWTFGG

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0172398 A1 (Borges, et al.) 14 July 2011 (14.07.2011) para [0013]-[0015], [0021]-[0022], [0095]	1, 7-8
A	US 2010/0076178 A1 (Ghayur, et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) para [0012]-[0013], [0055]	1, 7-8
A	US 2010/0150940 A1 (Adam, et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) para [0047], SEQ ID NO: 1	1, 7-8
A	US 2011/0165162 A1 (Hoey, et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0021], SEQ ID NOs: 7-9	1, 7-8
A	US 2004/0265307 A1 (Singh, et al.) 30 December 2004 (30.12.2004) para [0022], SEQ ID NO: 2	1, 7-8
A	US 2004/0123343 A1 (La Rosa, et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) para [0005], SEQ ID NO: 130866	1, 7-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
07 February 2013 (07.02.2013)	28 FEB 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/56886

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.: 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84
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:

Group I+: claims 1-8, 10-17, 28-43, 46-54, 56, 63, 67, and 85-89 drawn to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 17-22 (Claims 1 and 7-8). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

- Please see extra sheet for continuation -

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 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, 7-8, restricted to SEQ ID NOs: 17-22

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/US 12/56886

Continuation of:
Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0172398 A1 to Borges et al. (hereinafter 'Borges'). Borges discloses an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4 (para [0013]-[0015] and [0095]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequences. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

ANTE LA OFICINA INTERNACIONAL DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Con respecto a la solicitud de: OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

Número de Solicitud Internacional: PCT/US2012/056886

Fecha de Presentación Internacional: 24 de Septiembre de 2012

Número de Expediente del Agente: 2293.084PC03

Título: **Agentes de Ligación a VEGF/DLL4 y Usos de los Mismos**

ENMIENDA BAJO EL ARTÍCULO 10 DE PCT

Oficina internacional de WIPO

34 chemin des Colombettes

1211 Ginebra 20

SUIZA

No. de Fax 011.4122.338.8270

Señor:

En respuesta al comunicado fechado el 2 de Mayo de 2013, pidiendo al solicitante que envíe una carta en cumplimiento con la Regla 46.5(b) para acompañar las enmiendas del Artículo 19 presentadas el 26 de Abril de 2013 en la presente solicitud, se hacen los siguientes comentarios.

Enmiendas

En las Reivindicaciones

Favor de cancelar las reivindicaciones 1 a 89 pendientes y reemplazarlas con las nuevas reivindicaciones 1 a 30 al reemplazarlas páginas 114 a 124 con las hojas de reemplazo 114 a 118. Las hojas de reemplazo 114 a 118 se envían con esta enmienda.

Explicación de las Enmiendas

En las reivindicaciones

Las enmiendas a las reivindicaciones se han hecho para definir más claramente el alcance de la protección buscada. El conjunto de reivindicaciones se ha acortado y el orden de presentación de las diversas modalidades ha cambiado.

Se cancelan las reivindicaciones pendientes 1-89. Se agregan las nuevas reivindicaciones 1-30.

La base para la nueva reivindicación 1 se puede encontrar en la reivindicación original 86.

La base para la nueva reivindicación 2 se puede encontrar en la reivindicación original 28.

La base para la nueva reivindicación 2 se puede encontrar en la reivindicación original 33.

La base para la nueva reivindicación 4 se puede encontrar en la reivindicación original 42.

La base para la nueva reivindicación 5 se puede encontrar en la reivindicación original 43.

La base para la nueva reivindicación 6 se puede encontrar en el párrafo [0102] de la especificación.

La base para la nueva reivindicación 7 se puede encontrar en las reivindicaciones originales 44 y 45.

La base para la nueva reivindicación 8 se puede

encontrar en las reivindicaciones originales 57, 59, 61 y 61.

La base para la nueva reivindicación 9 se puede encontrar en las reivindicaciones originales 47-50.

La base para la nueva reivindicación 10 se puede encontrar en la reivindicación original 56.

La base para la nueva reivindicación 11 se puede encontrar en la reivindicación original 1.

La base para la nueva reivindicación 12 se puede encontrar en la reivindicación original 2.

La base para la nueva reivindicación 13 se puede encontrar en la reivindicación original 6 y el párrafo [0118] de la especificación.

La base para la nueva reivindicación 14 se puede encontrar en la reivindicación original 7.

La base para la nueva reivindicación 15 se puede encontrar en el párrafo [0118] de la especificación.

La base para la nueva reivindicación 16 se puede encontrar en la reivindicación originales 10, 11, y 12.

La base para la nueva reivindicación 17 se puede encontrar en la reivindicación original 13.

La base para la nueva reivindicación 18 se puede encontrar en la reivindicación originales 19-27.

La base para la nueva reivindicación 19 se puede encontrar en la reivindicación original 70.

La base para la nueva reivindicación 20 se puede encontrar en la reivindicación original 64-65.

La base para la nueva reivindicación 21 se puede encontrar en la reivindicación original 66.

La base para la nueva reivindicación 22 se puede encontrar en la reivindicación original 68.

La base para la nueva reivindicación 23 se puede encontrar en la reivindicación original 69.

La base para la nueva reivindicación 24 se puede encontrar en la reivindicación original 63.

La base para la nueva reivindicación 25 se puede encontrar en la reivindicación original 76.

La base para la nueva reivindicación 26 se puede encontrar en la reivindicación original 77.

La base para la nueva reivindicación 27 se puede encontrar en la reivindicación originales 72 y 73.

La base para la nueva reivindicación 28 se puede encontrar en la reivindicación original 75.

La base para la nueva reivindicación 29 se puede encontrar en la reivindicación original 78.

La base para la nueva reivindicación 30 se puede encontrar en la reivindicación original 82 y el párrafo [0226] de la especificación.

Estos cambios se cree que no introducen nuevo contenido, y su ingreso se solicita respetuosamente.

Sumario

Estas enmiendas se hacen para definir más claramente el alcance de la protección buscada. Ningún nuevo contenido se ha agregado a la solicitud por medio de las enmiendas presentadas en la presente. Los solicitantes solicitan respetuosamente que estas enmiendas se introduzcan en la solicitud referida.

Enviado Respetuosamente,

Sterne Kessler, Goldstein Fox P.L.L.C.

(RÚBRICA)

Paul A. Calvo

Apoderado para Solicitantes

No. de Registro 57,913

Fecha: 5/31/2013

1100 New York Avenue, N. W.

Washington, D. C. 20005-3934

202.371.2600

1695292_1

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque comprende:

a) un primer sitio de ligación a antígeno que liga específicamente el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), y

b) un segundo sitio de ligación a antígeno que liga específicamente el ligando 4 similar a delta humano (DLL4), en donde el primer sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19);

en donde el segundo sito de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende $YIX_1X2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO: 80), en donde X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

en donde tanto el primero como el segundo sitios de ligación a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el segundo sitio de ligación a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16).

3. El anticuerpo biespecífico de conformidad con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende:

(a) una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 11;

(b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(c) una primera y segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

4. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque comprende un primer dominio y un segundo dominio CH3, cada uno de los cuales se modifica para promover la formación de heteromultímeros.

5. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque

el primero y segundo dominios CH3 se modifican basados en efectos electrostáticos.

6. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo IgG1, o un anticuerpo IgG2.

7. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 249 y 288 de SEQ ID NO:42, en donde los aminoácidos se reemplazan con glutamato o aspartato, y la segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones que corresponden a las posiciones 236 y 278 de SEQ ID NO:42, en donde los aminoácidos se reemplazan con lisina.

8. El anticuerpo biespecífico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque:

(i) inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF;

(ii) inhibe la ligación de DLL4 a por lo menos un receptor Notch;

(iii) inhibe la señalización Notch; y/o

(iv) modula la angiogénesis.

9. Un anticuerpo biespecífico que se liga

específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, caracterizado porque:

(a) una cadena pesada de SEQ ID NO:7;

(b) una cadena pesada de SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:56, o SEQ ID NO:62; y

(c) dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.

10. Un anticuerpo biespecífico, caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste de 219R45-MB-21M18, 219R45-MB- 21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83.

11. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al VEGF humano, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ED NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; y

(b) una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

13. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación

11, caracterizado porque comprende:

(a) una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:49 o SEQ ID NO:7; y

(b) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8.

14. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, caracterizado porque inhibe la ligación de VEGF a por lo menos un receptor VEGF.

15. Un anticuerpo aislado que se liga específicamente al DLL4 humano, caracterizado porque comprende:

(a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX[X_2YX$_3$X4ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), caracterizado porque X_1 es serina o alanina, X_2 es serina, asparagina, o glicina, X_3 es asparagina o lisina, y X_4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y

(b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

16. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY

(SEQ ID NO: 16).

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15 o reivindicación 16, caracterizado porque comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 12.

18. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11–17, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, o un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de ligación a antígeno.

19. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1–18 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20. Una célula, caracterizada porque comprende o produce el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1–18.

21. Una molécula de polinucleótido aislada, caracterizada porque comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1–18.

22. Un vector, caracterizado porque comprende el

polinucleótido de conformidad con la reivindicación 21.

23. Una célula, caracterizada porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 22.

24. Un polipéptido, caracterizado porque comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ED NO: 12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.

25. Uso del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1–18, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

26. El uso del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 25, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, linfoma y leucemia.

27. El uso del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1–18, en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un tumor.

28. El uso del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 27, en donde el tumor se selecciona del grupo

que consiste de tumor colorectal, tumor de colon, tumor de ovario, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de la vejiga, glioblastoma, y tumor de cabeza y cuello.

29. El uso del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en donde el uso comprende el anticuerpo y por lo menos un agente terapéutico adicional.

30. Un método para la producción de un anticuerpo, caracterizado porque comprende expresar por lo menos un polinucleótido de conformidad con la reivindicación 21 en una célula.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44*bis*)

Applicant's or agent's file reference 2293084PC03	**FOR FURTHER ACTION**	See item 4 below
International application No. PCT/US2012/056886	International filing date *(day/month/year)* 24 September 2012 (24.09.2012)	Priority date *(day/month/year)* 23 September 2011 (23.09.2011)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 *bis*.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

   In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	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 Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or 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

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44*bis*.3(c) and 93*bis*.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44*bis* .2).

	Date of issuance of this report 25 March 2014 (25.03.2014)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Philippe Bécamel e-mail: pt03.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: PAUL A. CALVO
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX, PLLC
1100 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20005

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	28 FEB 2013
Applicant's or agent's file reference 2293084PC03	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US 12/56886	24 September 2012 (24.09.2012)	23 September 2011 (23.09.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 (2012.01)
USPC - 424/136.1

Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.

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 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or 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 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 66.1 *bis*(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.

Name and mailing address of the ISA/US	Date of completion of this opinion	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	07 February 2013 (07.02.2013)	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

Box No. I Basis of this 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 43*bis*.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:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

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. 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84

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. see below are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

Claims 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ 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 said claims Nos. 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84

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

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

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 appicable 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:

Group I+: claims 1-8, 10-17, 28-43, 46-54, 56, 63, 67, and 85-89 drawn to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 17-22 (Claims 1 and 7-8). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0172398 A1 to Borges et al. (hereinafter 'Borges'). Borges discloses an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4 (para [0013]-[0015] and [0095]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequences. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1, 7-8, restricted to SEQ ID NOs: 17-22

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

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

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 7-8	YES
	Claims	None	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 7-8	YES
	Claims	None	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 7-8	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1 and 7-8 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor I comprising SEQ ID NOs: 17-22.

Borges, et al. (US 2011/0172398 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF) (para [0013]-[0015], [0021]-[0022] and [0095]), but does not specifically teach SEQ ID NOs: 17-22.

Ghayur, et al. (US 2010/0076178 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF) (para [0012]-[0013] and [0055]), but does not specifically teach SEQ ID NOs: 17-22.

Adam, et al. (US 2010/0150940 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human IGF-1 (abstract) comprising a heavy chain CDR1 SEQ ID NO: 1 (para [0047]) that is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 17.

Hoey, et al. (US 2011/0165162 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human DLL4 comprising (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO: 20) (para [0021], SEQ ID NO: 7 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO: 21) (para [0021], SEQ ID NO: 8 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO: 22) (para [0021], SEQ ID NO: 9 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 22).

Singh, et al. (US 2004/0265307 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human IGF-1 receptor (para [0018]) comprising a heavy chain CDR2 SEQ ID NO: 2 (para [0022]) that displays 86.8% match to claimed SEQ ID NO: 18. There is no prior art on record that discloses the claimed SEQ ID NO: 18.

La Rosa, et al. (US 2004/0123343 A1) provides a rice polypeptide sequence SEQ ID NO: 130866 (para [0005]) wherein amino acid residues 2-12 of SEQ ID NO: 130866 displays 64% match to claimed SEQ ID N: 19.

There is no prior art on record that specifically teach or fairly suggest to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor comprising SEQ ID NOs: 17-22.

Claims 1 and 7-8 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: PAUL A. CALVO
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX, PLLC
1100 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20005

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	28 FEB 2013
Applicant's or agent's file reference 2293084PC03	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US 12/56886	24 September 2012 (24.09.2012)	23 September 2011 (23.09.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 (2012.01)
USPC - 424/136.1

Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.

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 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or 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 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 66.1 *bis*(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.

Name and mailing address of the ISA/US	Date of completion of this opinion	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	07 February 2013 (07.02.2013)	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

Box No. I Basis of this 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 43*bis*.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:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

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. 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84

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. see below are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

Claims 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ 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 said claims Nos. 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84

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

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

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 appicable 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:

Group I+: claims 1-8, 10-17, 28-43, 46-54, 56, 63, 67, and 85-89 drawn to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 17-22 (Claims 1 and 7-8). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0172398 A1 to Borges et al. (hereinafter 'Borges'). Borges discloses an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4 (para [0013]-[0015] and [0095]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequences. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1, 7-8, restricted to SEQ ID NOs: 17-22

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/56886

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

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 7-8	YES
	Claims	None	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 7-8	YES
	Claims	None	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 7-8	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1 and 7-8 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor I comprising SEQ ID NOs: 17-22.

Borges, et al. (US 2011/0172398 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF) (para [0013]-[0015], [0021]-[0022] and [0095]), but does not specifically teach SEQ ID NOs: 17-22.

Ghayur, et al. (US 2010/0076178 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF) (para [0012]-[0013] and [0055]), but does not specifically teach SEQ ID NOs: 17-22.

Adam, et al. (US 2010/0150940 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human IGF-1 (abstract) comprising a heavy chain CDR1 SEQ ID NO: 1 (para [0047]) that is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 17.

Hoey, et al. (US 2011/0165162 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human DLL4 comprising (b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO: 20) (para [0021], SEQ ID NO: 7 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO: 21) (para [0021], SEQ ID NO: 8 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO: 22) (para [0021], SEQ ID NO: 9 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 22).

Singh, et al. (US 2004/0265307 A1) teaches an isolated antibody that specifically binds human IGF-1 receptor (para [0018]) comprising a heavy chain CDR2 SEQ ID NO: 2 (para [0022]) that displays 86.8% match to claimed SEQ ID NO: 18. There is no prior art on record that discloses the claimed SEQ ID NO: 18.

La Rosa, et al. (US 2004/0123343 A1) provides a rice polypeptide sequence SEQ ID NO: 130866 (para [0005]) wherein amino acid residues 2-12 of SEQ ID NO: 130866 displays 64% match to claimed SEQ ID N: 19.

There is no prior art on record that specifically teach or fairly suggest to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor comprising SEQ ID NOs: 17-22.

Claims 1 and 7-8 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

Anticuerpo Biespecífico	Región de ligación a Anti-VEGF			Región de ligación a Anti-DLL4		
	Cadena Pesada			Cadena Pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
219R45-MB-21M18	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R79	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R75	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
219R45-MB-21R83	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)

Anticuerpo Biespecífico	Regiones de ligación a Anti-VEGF y Anti-DLL4		
	Cadena Ligera		
	CDR1	CDR2	CDR3
219R45-MB-21M18	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R79	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R75	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R83	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

Figura 1A

Figura 1B

Anticuerpo Biespecífico	Región de ligación a Anti-VEGF		Región de ligación a Anti-DLL4	
	Región Variable de Cadena Pesada	Región Variable de Cadena Ligera	Región Variable de Cadena Pesada	Región Variable de Cadena Ligera
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:12

Figura 1C

Anticuerpo Biespecífico	Región de ligación a Anti-VEGF		Región de ligación a Anti-DLL4	
	Cadena Pesada	Cadena Ligera	Cadena Pesada	Cadena Ligera
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:57 SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:63 SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:8

Figura 2

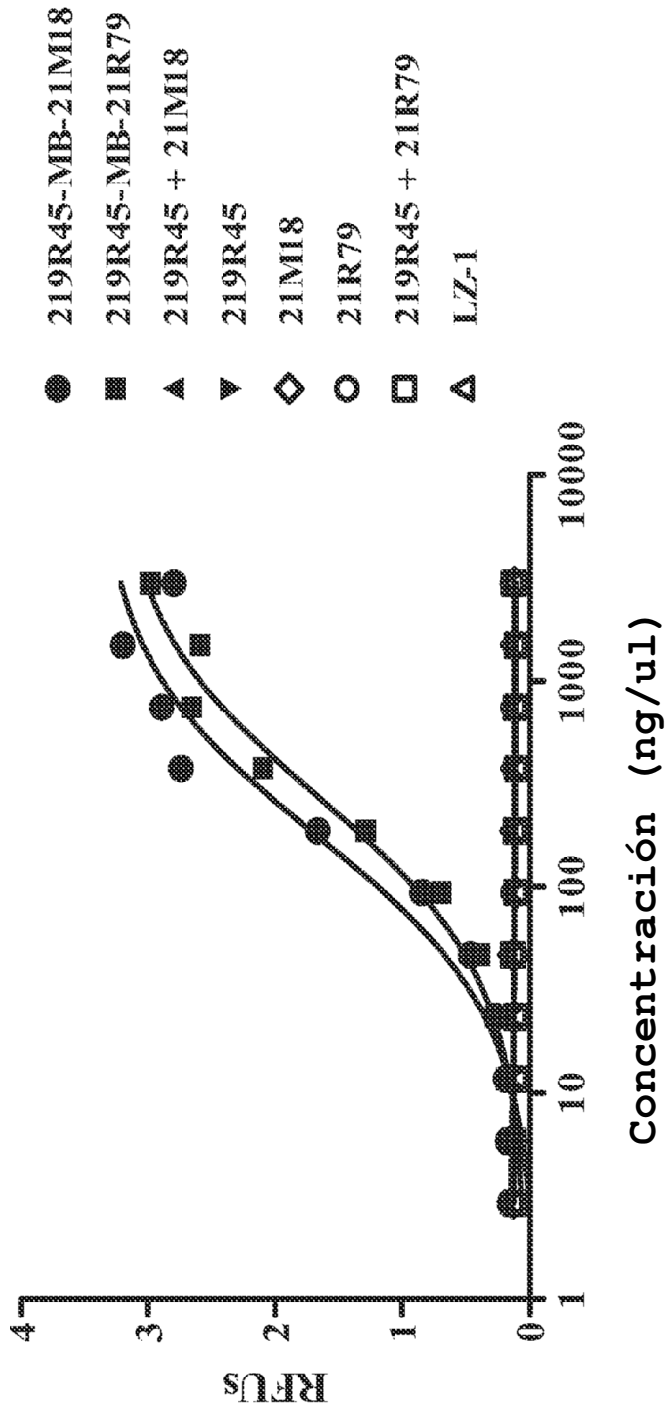

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
219R45 + 21M18
219R45
21M18
21R79
219R45 + 21R79
LZ-1
RFUs
0
1
2
3
4
1
10
100
1000
10000
Concentración (ng/ul)

Figura 3

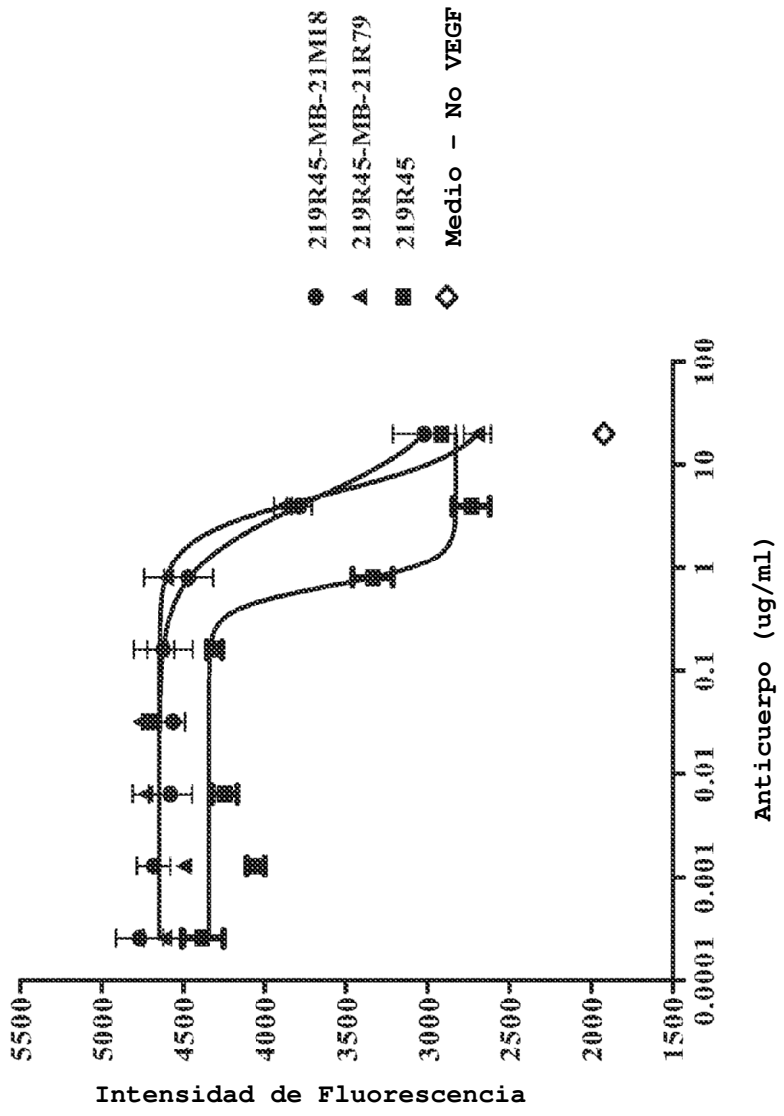

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
219R45
Medio - No VEGF
Intensidad de Fluorescencia
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Anticuerpo (ug/ml)

Figura 4

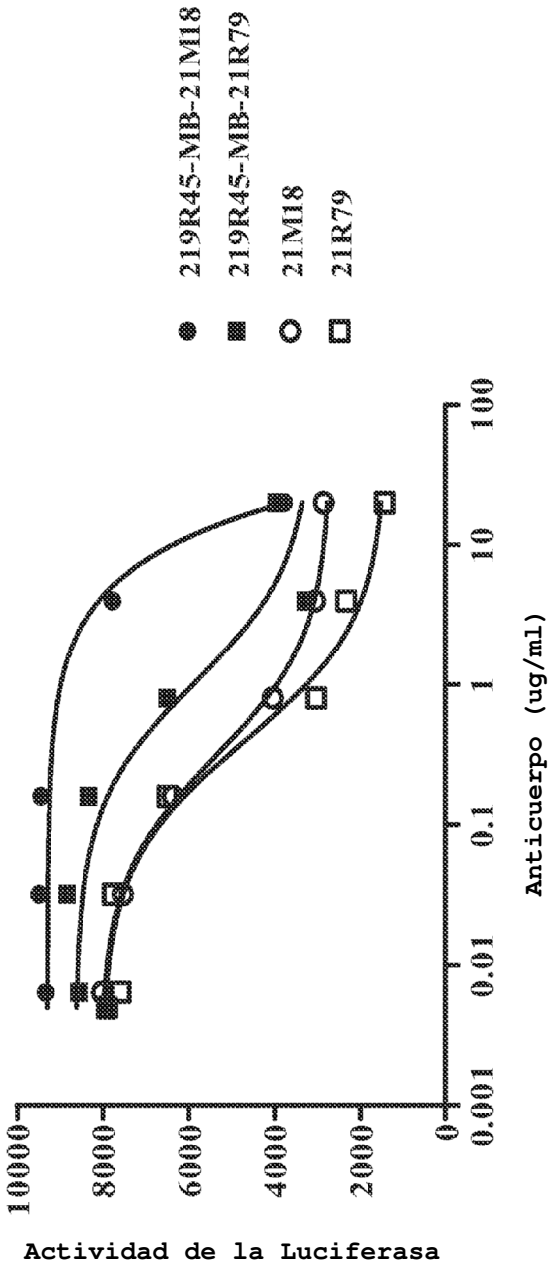

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79
21M18
21R79
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Anticuerpo (ug/ml)
Actividad de la Luciferasa

Figura 5

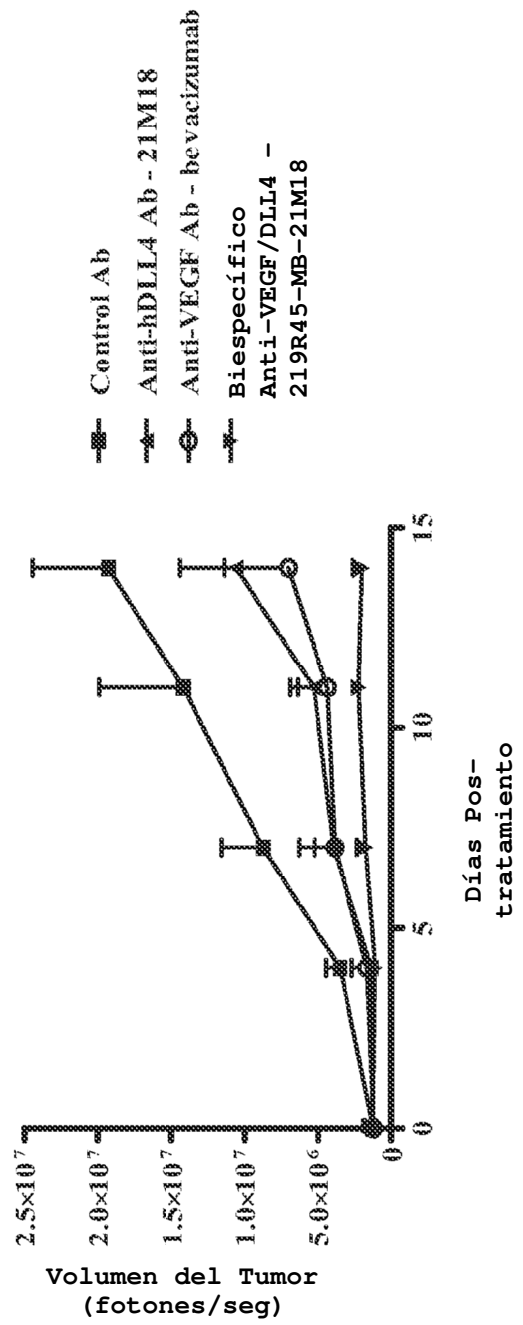

Control Ab
Anti-hDLL4 Ab - 21M18
Anti-VEGF Ab - bevacizumab
Biespecífico
Anti-VEGF/DLL4 -
219R45-MB-21M18
2.5×10^7
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
0
5
10
15
Volumen del Tumor
(fotones/seg)
Días Pos-
tratamiento

Figura 6

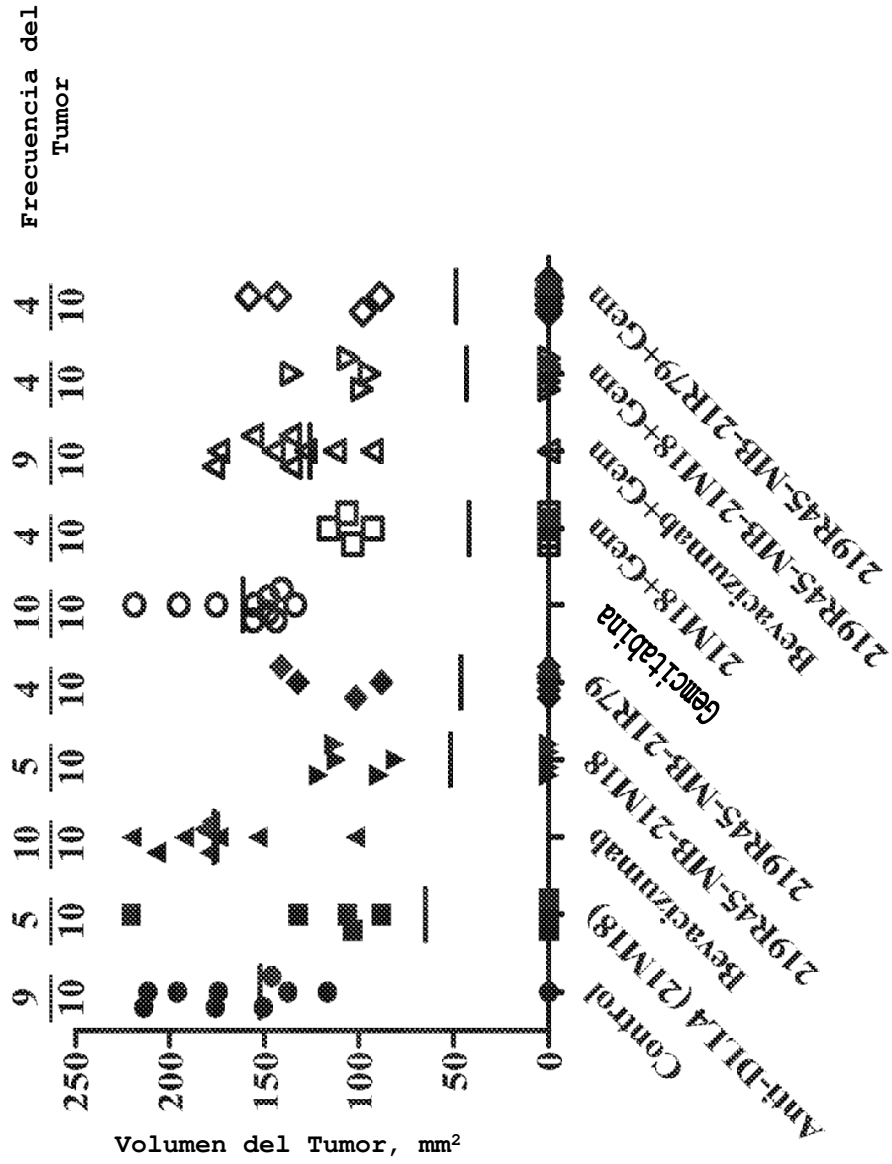

Frecuencia del Tumor
9/10
5/10
10/10
5/10
4/10
10/10
4/10
9/10
4/10
4/10
250
200
150
100
50
0
Volumen del Tumor, mm²
Anti-DLL4 (21M18)
Control
Bevacizumab
21PR45-MB-21M18
21PR45-MB-21R79
Gemcitabina
21M18+Gem
Bevacizumab+Gem
21PR45-MB-21M18+Gem
21PR45-MB-21R79+Gem

Figura 7

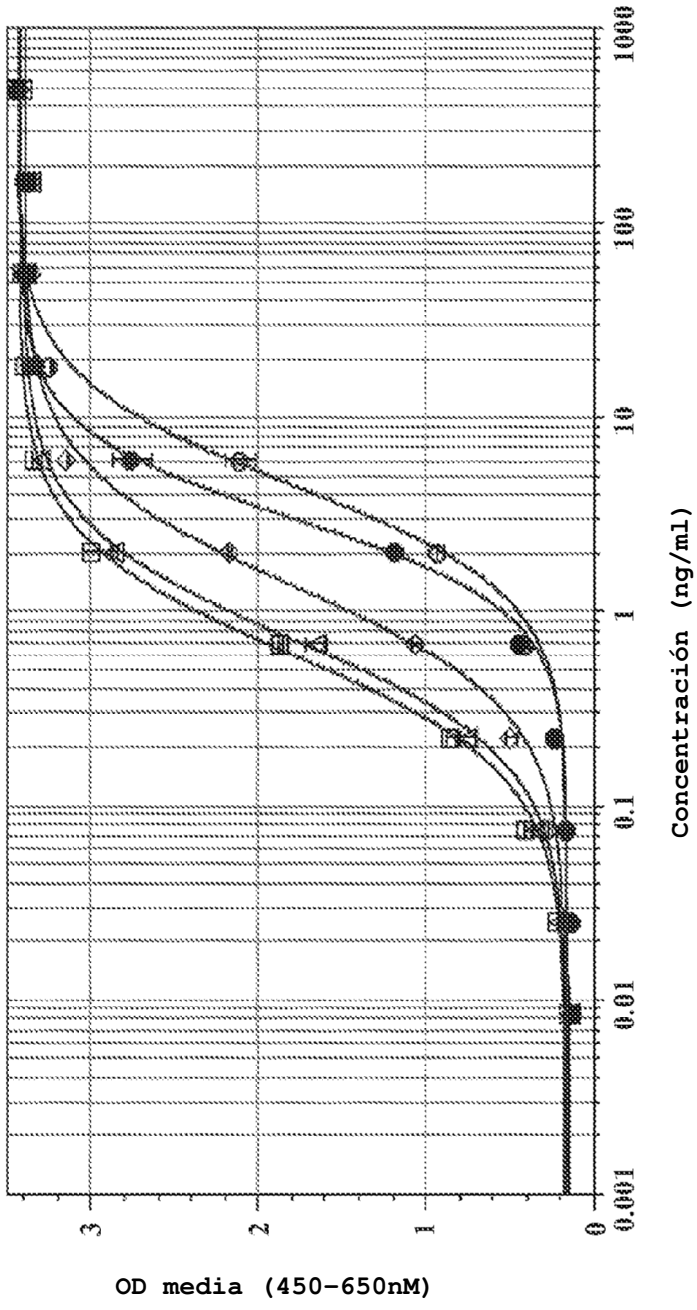

1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
Concentración (ng/ml)
3
2
1
0
OD media (450-650nM)

Figura 8

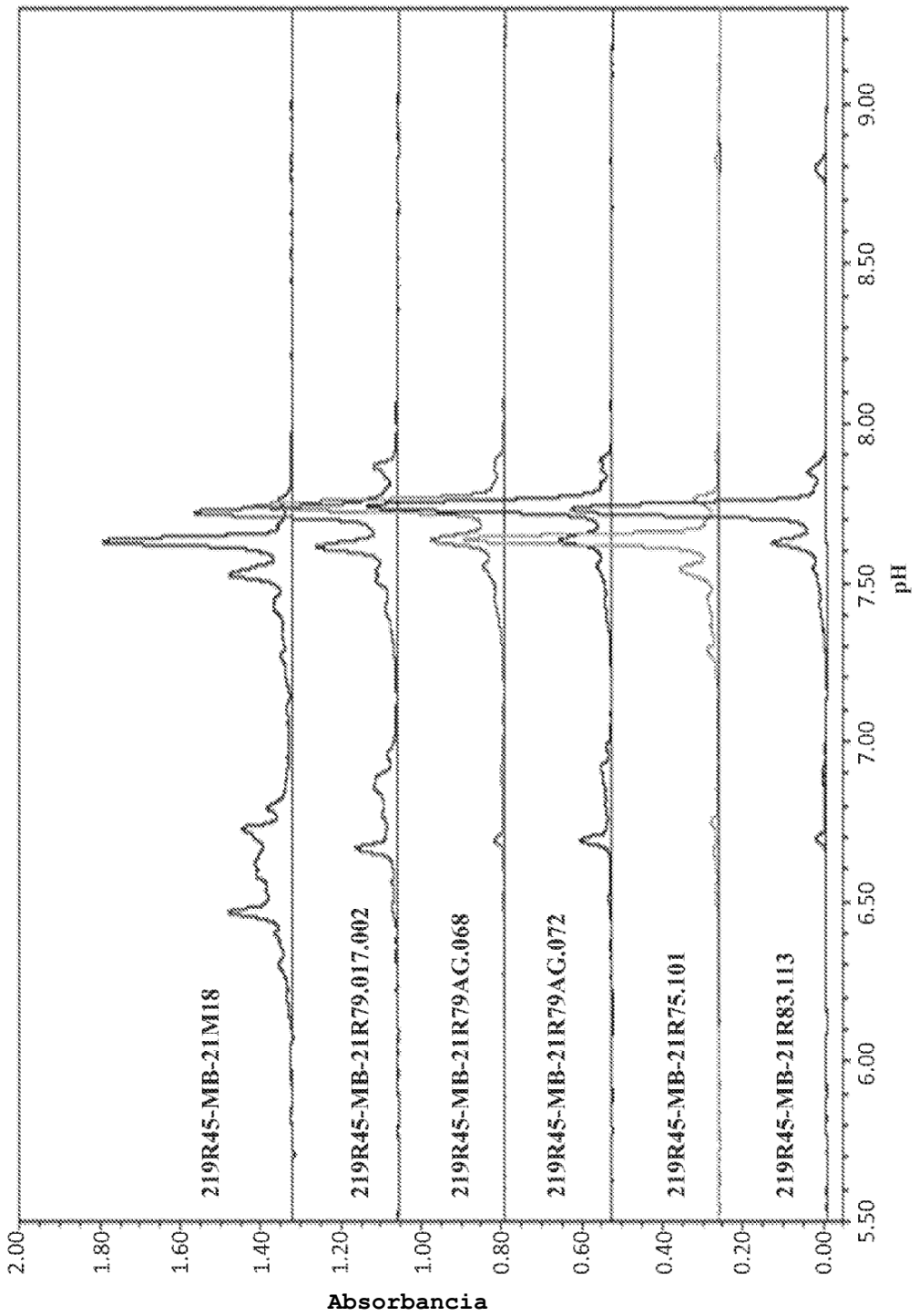

219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R79.017.002
219R45-MB-21R79AG.068
219R45-MB-21R79AG.072
219R45-MB-21R75.101
219R45-MB-21R83.113
Absorbancia
pH
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00

Figura 9

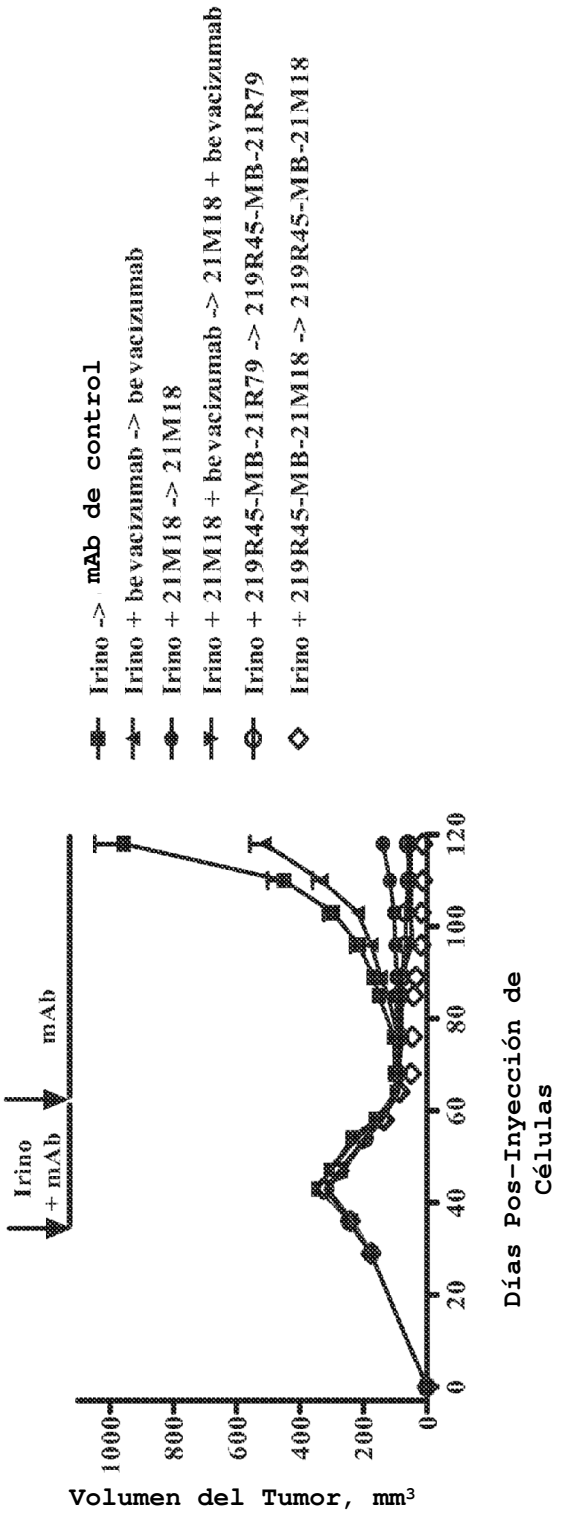

Irino -> mAb de control
Irino + bevacizumab -> bevacizumab
Irino + 21M18 -> 21M18
Irino + 21M18 + bevacizumab -> 21M18 + bevacizumab
Irino + 219R45-MB-21R79 -> 219R45-MB-21R79
Irino + 219R45-MB-21M18 -> 219R45-MB-21M18
Irino + mAb
mAb
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
Volumen del Tumor, mm3
Días Pos-Inyección de Células

Figura 10

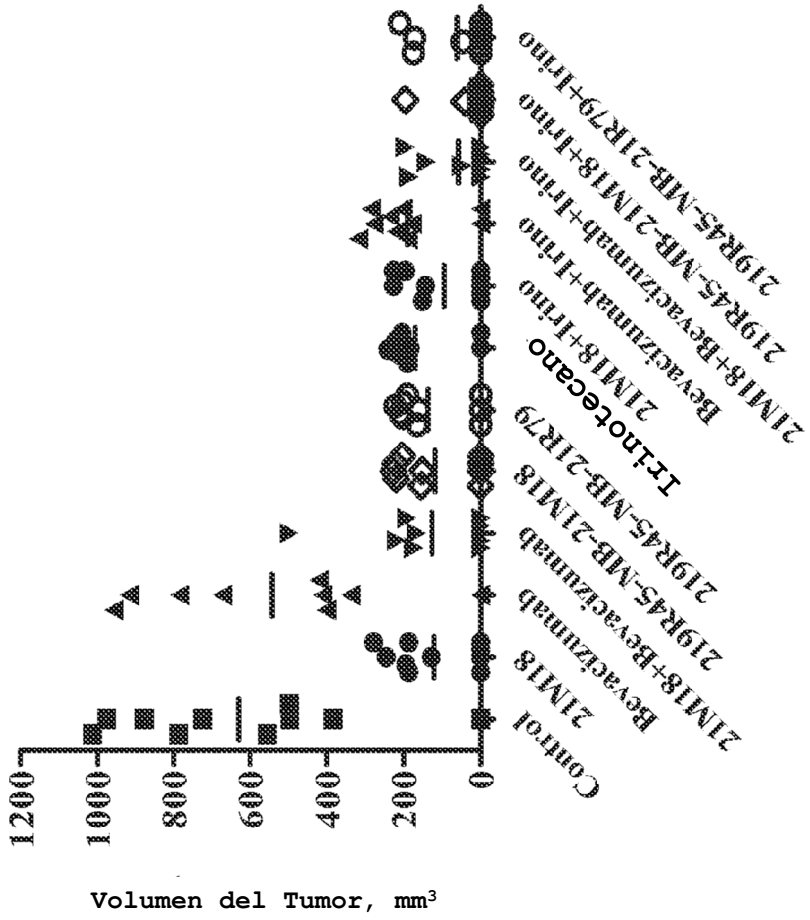
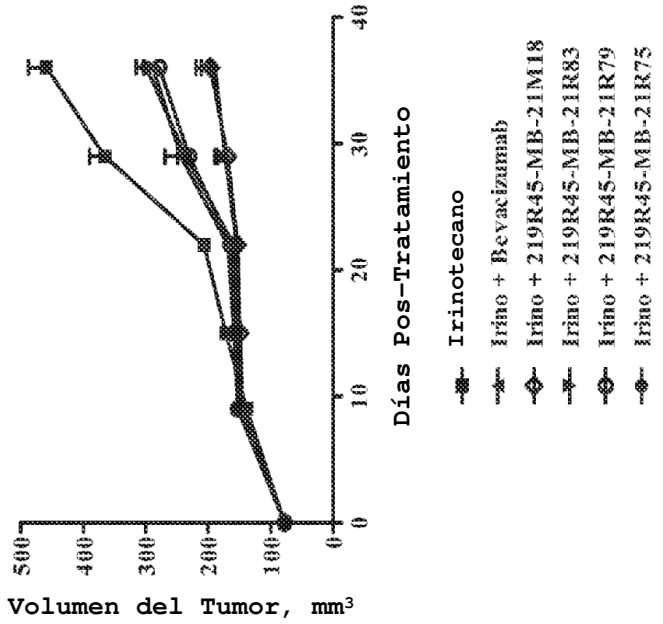
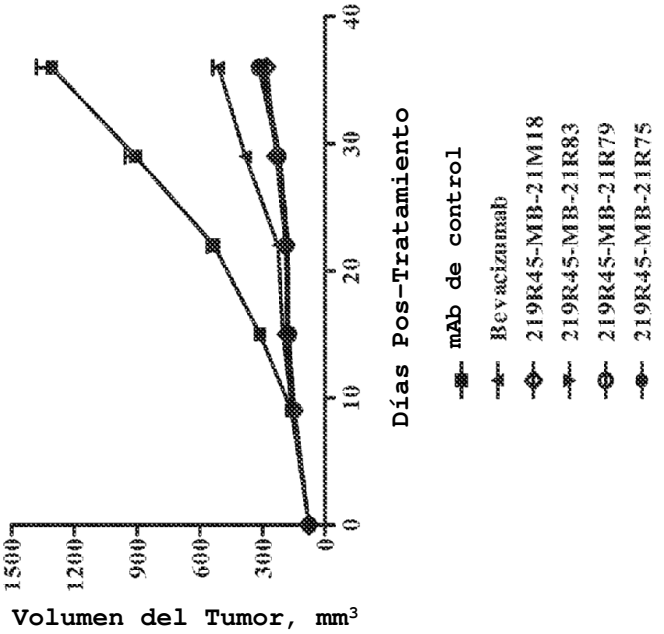

Control
21M18
Bevacizumab
21M18+Bevacizumab
21R45-MB-21M18
21R45-MB-21R79
Irinotecano
21M18+Irino
Bevacizumab+Irino
21M18+Bevacizumab+Irino
21R45-MB-21M18+Irino
21R45-MB-21R79+Irino
0
200
400
600
800
1000
1200
Volumen del Tumor, mm3

Figura 11


Volumen del Tumor, mm3
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Días Pos-Tratamiento
Irinotecano
Irino + Bevacizumab
Irino + 219R45-MB-21M18
Irino + 219R45-MB-21R83
Irino + 219R45-MB-21R79
Irino + 219R45-MB-21R75


Volumen del Tumor, mm3
1500
1200
900
600
300
0
0
10
20
30
40
Días Pos-Tratamiento
mAb de control
Bevacizumab
219R45-MB-21M18
219R45-MB-21R83
219R45-MB-21R79
219R45-MB-21R75

What is claimed is:

1. A bispecific antibody comprising:

a) a first antigen-binding site that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), and

b) a second antigen-binding site that specifically binds human delta-like 4 ligand (DLL4),

wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19);

wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glycine, arginine, or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and

wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. The bispecific antibody of claim 1, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16).

3. The bispecific antibody of claim 1 or claim 2, which comprises:

(a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and

(c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

4. The bispecific antibody of any one of claims 1-3, which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers.

5. The bispecific antibody of any one of claims 1-4, wherein the first and second CH3 domains are modified based upon electrostatic effects.

6. The bispecific antibody of any one of claims 1-5, which is a monoclonal antibody, a recombinant antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an IgG1 antibody, or an IgG2 antibody.

7. The bispecific antibody of any one of claims 1-5, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions corresponding to positions 249 and 288 of SEQ ID NO:42, wherein the amino acids are replaced with glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions corresponding to positions 236 and 278 of SEQ ID NO:42, wherein the amino acids are replaced with lysine.

8. The bispecific antibody of any one of claims 1-7, which:
   (i) inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor;
   (ii) inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor;
   (iii) inhibits Notch signaling; and/or
   (iv) modulates angiogenesis.

9. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising:
   (a) a heavy chain of SEQ ID NO:7;
   (b) a heavy chain of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:56, or SEQ ID NO:62; and
   (c) two light chains of SEQ ID NO:8.

10. A bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

11. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
   (a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and

(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. The antibody of claim 11, which comprises:

(a) a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and

(b) a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

13. The antibody of claim 11, which comprises:

(a) a heavy chain comprising SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:7; and

(b) a light chain comprising SEQ ID NO:8.

14. The antibody of any one of claims 11-13, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

15. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:

(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glycine, arginine, or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and

(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

16. The antibody of claim 15, which comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16).

17. The antibody of claim 15 or claim 16, which comprises:

(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and

(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

18. The antibody of any one of claims 11-17, which is a monoclonal antibody, a recombinant antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, a bispecific antibody, an IgG1 antibody, an IgG2 antibody, or an antibody fragment comprising an antigen-binding site.

19. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1-18 and a pharmaceutically acceptable carrier.

20. A cell comprising or producing the antibody of any one of claims 1-18.

21. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide that encodes the antibody of any one of claims 1-18.

22. A vector comprising the polynucleotide of claim 21.

23. A cell comprising the polynucleotide of claim 22.

24. A polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

25. Use of the antibody of any one of claims 1-18 in the manufacture of a medicament for treatment of cancer.

26. The use of the antibody of claim 25, wherein the cancer is selected from the group consisting of colorectal cancer, colon cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, head and neck cancer, lymphoma and leukemia.

27. Use of the antibody of any one of claims 1-18 in the manufacture of a medicament for inhibiting growth of a tumor.

28. The use of the antibody of claim 27, wherein the tumor is selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, ovarian tumor, pancreatic tumor, lung tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor.

29. The use of the antibody of any one of claims 25-28, wherein the use comprises the antibody and at least one additional therapeutic agent.

30. A method for the production of an antibody, comprising expressing at least one polynucleotide of claim 21 in a cell.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2293084PC03	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 12/56886	International filing date *(day/month/year)* 24 September 2012 (24.09.2012)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 23 September 2011 (23.09.2011)
Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.		

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 5 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 43.6*bis*(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, 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/US 12/56886

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out 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

2. ☒ 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.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/56886

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.: 9, 18-27, 44-45, 55, 57-62, 64-66, and 68-84
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:

Group I+: claims 1-8, 10-17, 28-43, 46-54, 56, 63, 67, and 85-89 drawn to an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 17-22 (Claims 1 and 7-8). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

- Please see extra sheet for continuation -

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 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, 7-8, restricted to SEQ ID NOs: 17-22

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/US 12/56886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 (2012.01)
USPC - 424/136.1
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)
USPC: 424/136.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 530/387.3, 530/389.2, 536/23.53, 536/23.1 (keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), PatBase, Google Patents/Scholar
Search Terms Used: VEGF antibody, NYWMH, DINPSNGRTSYKEKFKR, HYDDKYYPLMDY, RASESVDNYGISFMK, AASNQGS, QQSKEVPWTFGG

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0172398 A1 (Borges, et al.) 14 July 2011 (14.07.2011) para [0013]-[0015], [0021]-[0022], [0095]	1, 7-8
A	US 2010/0076178 A1 (Ghayur, et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) para [0012]-[0013], [0055]	1, 7-8
A	US 2010/0150940 A1 (Adam, et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) para [0047], SEQ ID NO: 1	1, 7-8
A	US 2011/0165162 A1 (Hoey, et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0021], SEQ ID NOs: 7-9	1, 7-8
A	US 2004/0265307 A1 (Singh, et al.) 30 December 2004 (30.12.2004) para [0022], SEQ ID NO: 2	1, 7-8
A	US 2004/0123343 A1 (La Rosa, et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) para [0005], SEQ ID NO: 130866	1, 7-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
07 February 2013 (07.02.2013)	28 FEB 2013

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/56886

Continuation of:
Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions of Group I+ share the technical feature of an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0172398 A1 to Borges et al. (hereinafter 'Borges'). Borges discloses an isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), human delta-like ligand 4 (DLL4) or VEGF and DLL4 (para [0013]-[0015] and [0095]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequences. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Group I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

BEFORE THE INTERNATIONAL BUREAU OF THE WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

In re application of: **OncoMed Pharmaceuticals, Inc.**

International Application Number: **PCT/US2012/056886**

International Filing Date: **24 September 2012**

Agent's Docket Number: **2293.084PC03**

Title: **VEGF/DLL4 Binding Agents and Uses Thereof**

AMENDMENT UNDER PCT ARTICLE 19

International Bureau of WIPO
34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
SWITZERLAND

Fax No. 011.4122.338.8270

Sir:

Applicant respectfully submits the following amendment and replacement sheets.

Amendment

In the Claims

Please cancel pending claims 1 through 89 and replace them with new claims 1 through 30 by replacing pages 114 through 124 with replacement sheets 114 through 118. Replacement sheets 114 through 118 are submitted with this amendment.

Explanation of Amendments

In the Claims

The amendments to the claims have been made to more clearly define the scope of protection sought. In accordance with Article 20(2), this communication contains the full text of the claims both as filed and as amended.

These changes are believed to introduce no new matter, and their entry is respectfully requested.

Summary

These amendments are made to more clearly define the scope of protection sought. No new matter has been added to the application by way of the amendments presented herein. Applicants respectfully request that these amendments be introduced into the captioned application.

Respectfully submitted,

STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX P.L.L.C.

Paul A. Calvo
Attorney for Applicants
Registration No. 57,913

Date: 26 April 2013

1100 New York Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20005-3934
202.371.2600

1680929_1

ORIGINAL

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically binds human vascular endothelial growth factor (VEGF), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

2. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

3. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

4. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

5. The antibody of claim 2, which comprises:
(a) a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:11; and
(b) a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

6. An isolated antibody that specifically binds human VEGF, which comprises:
(a) a heavy chain consisting essentially of SEQ ID NO:49 or SEQ ID NO:7; and
(b) a light chain consisting essentially of SEQ ID NO:8.

7. The antibody according to any one of claims 1-6, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

8. The antibody of claim 7, wherein the VEGF receptor is VEGFR-1 or VEGFR-2.

9. The antibody according to any one of claims 1-8, which modulates angiogenesis.

10. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

11. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

12. An isolated antibody that specifically binds human delta-like ligand 4 (DLL4), which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65) and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
(b) a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

13. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(b) a light chain variable region comprising SEQ ID NO:12.

14. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(b) a light chain variable region consisting essentially of SEQ ID NO:12.

ORIGINAL

15. An isolated antibody that specifically binds human DLL4, which comprises:
(a) a heavy chain consisting essentially of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, or SEQ ID NO:62; and
(b) a light chain consisting essentially of SEQ ID NO:8.

16. The antibody according to any one of claims 10-15, which inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor.

17. The antibody of claim 16, wherein the Notch receptor is selected from the group consisting of Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4.

18. The antibody according to any one of claims 10-17, which inhibits Notch signaling.

19. The antibody according to any one of claims 10-18, which is a monoclonal antibody.

20. The antibody according to any one of claims 10-19, which is a recombinant antibody.

21. The antibody according to any one of claims 1-20, which is a chimeric antibody.

22. The antibody according to any one of claims 1-21, which is a humanized antibody.

23. The antibody according to any one of claims 1-19, which is a human antibody.

24. The antibody according to any one of claims 1-23, which is a bispecific antibody.

25. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an IgG1 antibody.

26. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an IgG2 antibody.

27. The antibody according to any one of claims 1-24, which is an antibody fragment comprising an antigen-binding site.

28. A bispecific antibody comprising:
a) a first antigen-binding site that specifically binds human VEGF, and

b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4,
wherein the first antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19);
wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR1 comprising TAYYIH (SEQ ID NO:13), a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), or YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and
wherein both the first and second antigen-binding sites comprise a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

29. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14).

30. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15).

31. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59).

32. A bispecific antibody of claim 28, wherein the second antigen-binding site comprises a heavy chain CDR2 comprising YISNYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65).

33. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, which comprises:
(a) a first heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:11;
(b) a second heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, or SEQ ID NO:64; and
(c) a first and a second light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:12.

34. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:9; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

35. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:10; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

36. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:58; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

37. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:64; and

(c) the first and the second light chain variable regions have at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:12.

38. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:9; and

(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

39. The bispecific antibody of claim 33, wherein

(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;

(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:10; and

(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

ORIGINAL

40. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;
(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:58; and
(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

41. The bispecific antibody of claim 33, wherein
(a) the first heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:11;
(b) the second heavy chain variable region consists essentially of SEQ ID NO:64; and
(c) the first and the second light chain variable regions consist essentially of SEQ ID NO:12.

42. The bispecific antibody according to any one of claims 28-41, which comprises a first CH3 domain and a second CH3 domain, each of which is modified to promote formation of heteromultimers.

43. The bispecific antibody of claim 42, wherein the first and second CH3 domains are modified based upon electrostatic effects.

44. The bispecific antibody according to any one of claims 28-43, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine.

45. The bispecific antibody according to any one of claims 28-43, which comprises a first human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 236 and 278, wherein the amino acids are lysine, and a second human IgG2 constant region with amino acid substitutions at positions 249 and 288, wherein the amino acids are glutamate or aspartate.

46. The bispecific antibody of claim 42, wherein the first and second CH3 domains are modified using a knobs-into-holes technique.

47. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:5, and two light chains of SEQ ID NO:8.

ORIGINAL

48. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:6, and two light chains of SEQ ID NO:8.

49. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:56, and two light chains of SEQ ID NO:8.

50. A bispecific antibody that specifically binds human VEGF and human DLL4, comprising a heavy chain of SEQ ID NO:7, a heavy chain of SEQ ID NO:62, and two light chains of SEQ ID NO:8.

51. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an N-terminal fragment of human DLL4 (amino acids 1-191 of SEQ ID NO:24).

52. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25.

53. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

54. The bispecific antibody according to any one of claims 28-32, wherein the second antigen-binding site binds an epitope comprising amino acids 40-47 of SEQ ID NO:25 and amino acids 113-120 of SEQ ID NO:25.

55. The bispecific antibody according to any one of claims 28-46, wherein the first antigen-binding site binds human VEGF with a K_D of about 100nM or less and the second antigen-binding site binds human DLL4 with a K_D of about 100nM or less.

56. A bispecific antibody selected from the group consisting of 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, and 219R45-MB-21R83.

57. The bispecific antibody according to any one of claims 28-56, which inhibits binding of VEGF to at least one VEGF receptor.

58. The bispecific antibody of claim 57, wherein the VEGF receptor is VEGFR-1 or VEGFR-2.

59. The bispecific antibody according to any one of claims 28-58, which inhibits binding of DLL4 to at least one Notch receptor.

60. The bispecific antibody of claim 59, wherein the Notch receptor is selected from the group consisting of Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4.

61. The bispecific antibody according to any one of claims 28-60, which inhibits Notch signaling.

62. The bispecific antibody according to any one of claims 28-61, which modulates angiogenesis.

63. A polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, and SEQ ID NO:64.

64. A cell comprising the antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

65. A cell producing the antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

66. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide that encodes an antibody or polypeptide according to any one of claims 1-63.

67. An isolated polynucleotide molecule comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, and SEQ ID NO:78.

68. A vector comprising the polynucleotide of claim 66 or claim 67.

69. A cell comprising the polynucleotide of claim 66 or claim 67 or the vector of claim 68.

ORIGINAL

70. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 1-62 and a pharmaceutically acceptable carrier.

71. A method of modulating angiogenesis in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

72. A method of inhibiting growth of a tumor, wherein the method comprises contacting the tumor with an effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

73. A method of inhibiting growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

74. A method of reducing the frequency of cancer stem cells in a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

75. The method according to any one of claims 72-74, wherein the tumor is selected from the group consisting of colorectal tumor, colon tumor, ovarian tumor, pancreatic tumor, lung tumor, liver tumor, breast tumor, kidney tumor, prostate tumor, gastrointestinal tumor, melanoma, cervical tumor, bladder tumor, glioblastoma, and head and neck tumor.

76. A method of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody according to any one of claims 1-27 or a bispecific antibody according to any one of claims 28-62.

77. The method of claim 76, wherein the cancer is selected from the group consisting of colorectal cancer, colon cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer, kidney cancer, prostate cancer, gastrointestinal cancer, melanoma, cervical cancer, bladder cancer, glioblastoma, head and neck cancer, lymphoma and leukemia.

78. The method according to any one of claims 71-77, which further comprises administering a second therapeutic agent.

ORIGINAL

79. The method of claim 78, wherein the second therapeutic agent is a chemotherapeutic agent.

80. The method of claim 78, wherein the second therapeutic agent is a second antibody.

81. The method according to any one of claims 71 or 73-80, wherein the subject is human.

82. A method for the production of a bispecific antibody, comprising expressing at least one polynucleotide of claim 66 or claim 67 in a cell.

83. The method of claim 82, wherein the cell is a prokaryotic cell or a eukaryotic cell.

84. The method of claim 82 or claim 83, further comprising isolating the bispecific antibody from the cell or the cell culture supernatant.

85. An antibody comprising a first antigen-binding site that specifically binds human DLL4, wherein the first antigen-binding site comprises TAYYIH (SEQ ID NO:13) or AYYIH (SEQ ID NO:79), a heavy chain CDR2 comprising $YIX_1X_2YX_3X_4ATNYNQKFKG$ (SEQ ID NO:80), wherein X_1 is serine or alanine, X_2 is serine, asparagine, or glycine, X_3 is asparagine or lysine, and X_4 is glysine, arginine,or aspartic acid , and a heavy chain CDR3 comprising RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

86. The antibody of claim 85 which is a bispecific antibody and further comprises a second antigen-binding site, wherein the second antigen-binding site specifically binds human VEGF and comprises a heavy chain CDR1 comprising NYWMH (SEQ ID NO:17), a heavy chain CDR2 comprising DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), and a heavy chain CDR3 comprising HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19) ; and a light chain CDR1 comprising RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), a light chain CDR2 comprising AASNQGS (SEQ ID NO:21), and a light chain CDR3 comprising QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

87. A bispecific antibody comprising (a) a first antigen-binding site that binds human VEGF with a K_D between about 0.1nM and about 1.0 nM and (b) a second antigen-binding site that specifically binds human DLL4 with a K_D between about 0.1 nM and about 20 nM.

ORIGINAL

88. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to any one of claims 85-87 and a pharmaceutically acceptable carrier.

89. A method of treating cancer in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody according to any one of claims 85-87.