



CSA221043

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltd.

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION



ENTIDAD REGISTRO NACIONAL

08-129885

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

ANTICUERPOS ANTI-DLL4 Y MÉTODOS QUE LOS USAN

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

GENENTECH, INC.

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

PETITORIO

AS: 108.822



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129885-00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:51:42 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 433

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

06 ene 2009

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **GENENTECH, INC.**

Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco,
California 94080, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____
Número 80.410.337 TP 57492

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **Minhong YAN, Yan WU.**

Dirección: 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404, US; 1160 Blythe Street,
Foster City, California 94404, US (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/070513
Publicación Internacional No. WO 2008/060705 A2
WO 2008/060705

Fecha 06-06-2007
Fecha 22-05-2008 *Folio 5*

6 Título (54): ANTICUERPOS ANTI-DLL4 Y MÉTODOS QUE LOS USAN

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad

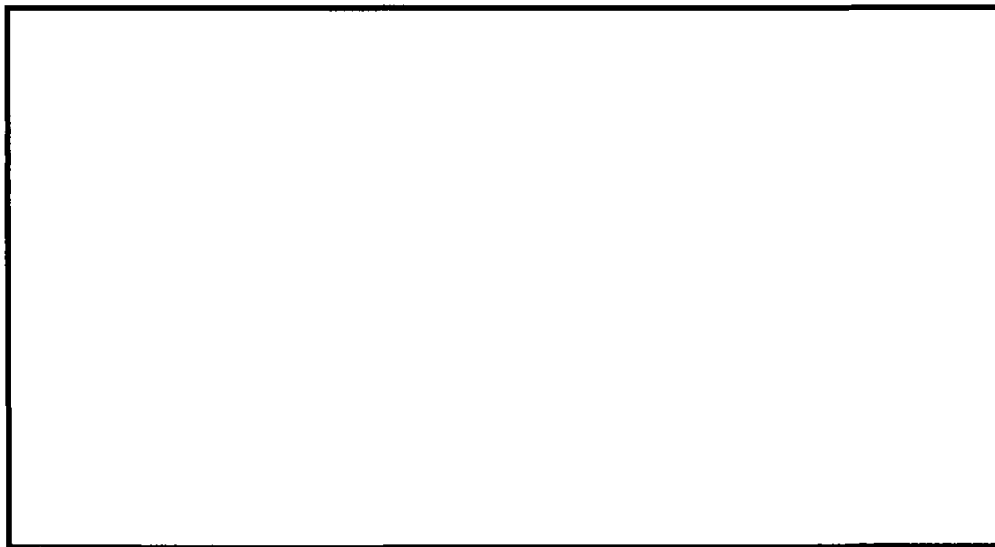
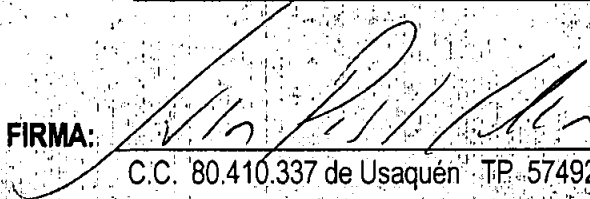
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	06-06-2006	60/811,349
US	06-06-2006	60/811,357
US	21-11-2006	60/866,772
US	21-11-2006	60/866,767

9 Comprobante de pago No. 08-85.493 Fecha 05-12-2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 501.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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 12x12.
- ☐ 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.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12** Solicito la concesión de la patente,NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

108 822

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 85,493
FECHA : OCTUBRE 29 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129885- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:51:42 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 433

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97848461	28/10/2008	30,638,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 May 2008 (22.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/060705 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01)

(74) Agents: KALINOWSKI, Grant et al.; Genentech, Inc., 1
DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080
(US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/070513

(22) International Filing Date: 6 June 2007 (06.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/811,349 6 June 2006 (06.06.2006) US
60/811,357 6 June 2006 (06.06.2006) US
60/866,772 21 November 2006 (21.11.2006) US
60/866,767 21 November 2006 (21.11.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YAN, Minhong
[US/US]; 411 Nantucket Street, Foster City, California
94404 (US). WU, Yan [US/US]; 1160 Blythe Street,
Foster City, California 94404 (US).

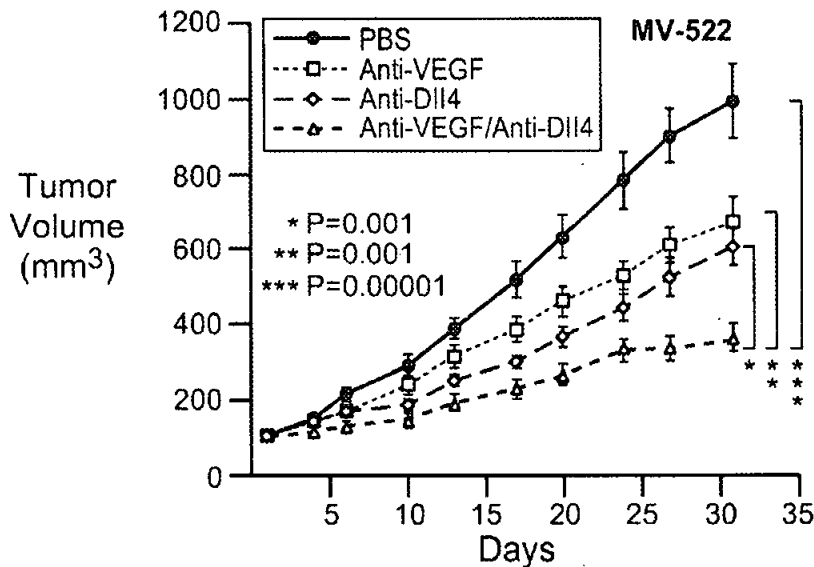
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, 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, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(54) Title: ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME



(57) Abstract: The invention provides anti-DLL4 antibodies, and compositions comprising and methods of using these antibodies.

WO 2008/060705 A2

ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates generally to the field of molecular biology. More specifically, the invention concerns anti-DLL4 antibodies, and uses of same.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Development of a vascular supply is a fundamental requirement for many
10 physiological and pathological processes. Actively growing tissues such as embryos and tumors require adequate blood supply. They satisfy this need by producing pro-angiogenic factors, which promote new blood vessel formation via a process called angiogenesis. Vascular tube formation is a complex but orderly biological event involving all or many of the following steps: a) endothelial cells (ECs) proliferate from existing ECs or differentiate
15 from progenitor cells; b) ECs migrate and coalesce to form cord-like structures; c) vascular cords then undergo tubulogenesis to form vessels with a central lumen; d) existing cords or vessels send out sprouts to form secondary vessels; e) primitive vascular plexus undergo further remodeling and reshaping; and f) peri-endothelial cells are recruited to encase the endothelial tubes, providing maintenance and modulatory functions to the vessels; such
20 cells including pericytes for small capillaries, smooth muscle cells for larger vessels, and myocardial cells in the heart. Hanahan, *Science* 277:48-50 (1997); Hogan & Kolodziej, *Nat. Rev. Genet.* 3:513-23 (2002); Lubarsky & Krasnow, *Cell* 112:19-28 (2003).

It is now well established that angiogenesis is implicated in the pathogenesis of a variety of disorders. These include solid tumors and metastasis, atherosclerosis, retrolental
25 fibroplasia, hemangiomas, chronic inflammation, intraocular neovascular diseases such as proliferative retinopathies, e.g., diabetic retinopathy, age-related macular degeneration (AMD), neovascular glaucoma, immune rejection of transplanted corneal tissue and other tissues, rheumatoid arthritis, and psoriasis. Folkman et al., *J. Biol. Chem.* 267:10931-34 (1992); Klagsbrun et al., *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39 (1991); and Garner A., "Vascular
30 diseases," In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

In the case of tumor growth, angiogenesis appears to be crucial for the transition from hyperplasia to neoplasia, and for providing nourishment for the growth and metastasis of the tumor. Folkman et al., *Nature* 339:58 (1989). The neovascularization

allows the tumor cells to acquire a growth advantage and proliferative autonomy compared to the normal cells. A tumor usually begins as a single aberrant cell which can proliferate only to a size of a few cubic millimeters due to the distance from available capillary beds, and it can stay 'dormant' without further growth and dissemination for a long period of time. Some tumor cells then switch to the angiogenic phenotype to activate endothelial cells, which proliferate and mature into new capillary blood vessels. These newly formed blood vessels not only allow for continued growth of the primary tumor, but also for the dissemination and recolonization of metastatic tumor cells. Accordingly, a correlation has been observed between density of microvessels in tumor sections and patient survival in breast cancer as well as in several other tumors. Weidner et al., *N. Engl. J. Med.* 324:1-6 (1991); Horak et al., *Lancet* 340:1120-24 (1992); Macchiarini et al., *Lancet* 340:145-46 (1992). The precise mechanisms that control the angiogenic switch is not well understood, but it is believed that neovascularization of tumor mass results from the net balance of a multitude of angiogenesis stimulators and inhibitors (Folkman, *Nat. Med.* 1(1):27-31 (1995)).

The process of vascular development is tightly regulated. To date, a significant number of molecules, mostly secreted factors produced by surrounding cells, have been shown to regulate EC differentiation, proliferation, migration and coalescence into cord-like structures. For example, vascular endothelial growth factor (VEGF) has been identified as the key factor involved in stimulating angiogenesis and in inducing vascular permeability. Ferrara et al., *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). The finding that the loss of even a single VEGF allele results in embryonic lethality points to an irreplaceable role played by this factor in the development and differentiation of the vascular system. Furthermore, VEGF has been shown to be a key mediator of neovascularization associated with tumors and intraocular disorders. Ferrara et al., *Endocr. Rev. supra.* The VEGF mRNA is overexpressed by the majority of human tumors examined. Berkman et al., *J. Clin. Invest.* 91:153-59 (1993); Brown et al., *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al., *Cancer Res.* 53:4727-35 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer* 73:931-34 (1996); Dvorak et al., *Am. J. Pathol.* 146:1029-39 (1995).

Also, the concentration levels of VEGF in eye fluids are highly correlated to the presence of active proliferation of blood vessels in patients with diabetic and other ischemia-related retinopathies. Aiello et al., *N. Engl. J. Med.* 331:1480-87 (1994). Furthermore, studies have demonstrated the localization of VEGF in choroidal neovascular

membranes in patients affected by AMD. Lopez et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-68 (1996).

Anti-VEGF neutralizing antibodies suppress the growth of a variety of human tumor cell lines in nude mice (Kim et al., *Nature* 362:841-44 (1993); Warren et al., *J. Clin. Invest.* 95:1789-97 (1995); Borgström et al., *Cancer Res.* 56:4032-39 (1996); Melnyk et al., *Cancer Res.* 56:921-24 (1996)) and also inhibit intraocular angiogenesis in models of ischemic retinal disorders (Adamis et al., *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)).

Therefore, anti-VEGF monoclonal antibodies or other inhibitors of VEGF action are promising candidates for the treatment of tumors and various intraocular neovascular disorders. Such antibodies are described, for example, in EP 817,648, published January 14, 1998; and in WO 98/45331 and WO 98/45332, both published October 15, 1998. One anti-VEGF antibody, bevacizumab, has been approved by the FDA for use in combination with a chemotherapy regimen to treat specific cancers and an anti-VEGF antibody fragment, ranibizumab, has been approved by the FDA to treat age-related (wet) macular degeneration. Both drugs are being investigated in ongoing clinical trials.

It is clear that there continues to be a need for agents that have clinical attributes that are optimal for development as therapeutic agents. The invention described herein meets this need and provides other benefits.

All references cited herein, including patent applications and publications, are incorporated by reference in their entirety.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is in part based on the identification of a variety of DLL4 binding agents (such as immunoconjugates, antibodies, and fragments thereof). DLL4 presents as an important and advantageous therapeutic target, and the invention provides compositions and methods based on binding DLL4. DLL4 binding agents of the invention, as described herein, provide important therapeutic and diagnostic agents for use in targeting pathological conditions associated with expression and/or activity of the DLL4-Notch receptor pathways. Accordingly, the invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture related to DLL4 binding.

The present invention provides antibodies that bind (such as specifically bind) to DLL4.

9

In one aspect, the invention provides an isolated anti-DLL4 antibody, wherein a full length IgG form of the antibody specifically binds human DLL4 with a binding affinity of about 1 nM or better, or about 500 pM or better. As is well-established in the art, binding affinity of a ligand to its receptor can be determined using any of a variety of assays, and expressed in terms of a variety of quantitative values. Accordingly, in one embodiment, the binding affinity is expressed as K_d values and reflects intrinsic binding affinity (e.g., with minimized avidity effects). Generally and preferably, binding affinity is measured in vitro, whether in a cell-free or cell-associated setting. Any of a number of assays known in the art, including those described herein, can be used to obtain binding affinity measurements, including, for example, Biacore®, radioimmunoassay (RIA) and ELISA. In some embodiments, the isolated anti-DLL4 antibody binds to both human and mouse DLL4 with similar affinity, i.e. the binding affinity for human DLL4 is no more than 100-fold more or less than the binding affinity for mouse DLL4. In some embodiments, the binding affinity for human DLL4 is no more than 10-fold more or less than the binding affinity for mouse DLL4. In some embodiments, the antibody specifically binds mouse DLL4 with a binding affinity of about 1 nM or better, or about 500 pM or better.

In one aspect, the invention provides an isolated anti-DLL4 antibody, wherein a full length IgG form of the antibody specifically binds human DLL4 with a k_{on} of about 2×10^5 or better, or about 1×10^5 or better. As is well-established in the art, the k_{on} of binding of a ligand to its receptor can be determined using any of a variety of assays and expressed in terms of a variety of quantitative values.

In one aspect, the invention provides an isolated antibody that binds a ligand binding region of DLL4. In some embodiments, the isolated antibody binds a polypeptide comprising, consisting of or consisting essentially of the DLL4 extracellular domain. In some embodiments, the isolated antibody binds a polypeptide comprising, consisting of or consisting essentially of amino acids 252-282, 1-252, 1-286, 1-324, and/or 219-286 of human DLL4.

In one aspect, the invention provides an isolated anti-DLL4 antibody that competes with Notch receptor for binding of DLL4.

In one aspect, the invention provides an isolated anti-DLL4 antibody that inhibits, reduces, and/or blocks DLL4 biological activity.

In one aspect, an anti-DLL4 antibody of the invention comprises:

(a) at least one, two, three, four, five or six hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of:

- (i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 10)
- (ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is SASFLYS (SEQ ID NO:11)
- 5 (iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQSYNGPST (SEQ ID NO:15)
- (iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1)
- (v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is
- 10 GVINPNSGATEYADSVKG (SEQ ID NO:5) and
- (vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F15, wherein F1-F15 is VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); and
- (b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NOs:1-18.
- 15 In one aspect, an anti-DLL4 antibody of the invention comprises:
- (a) at least one, two, three, four or five hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of:
- (i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 10)
- 20 (ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is SASFLYS (SEQ ID NO:11)
- (iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQSVNGPAT (SEQ ID NO:14)
- (iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GFSFRDNWIS
- 25 (SEQ ID NO:2);
- (v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is GVINPNSGSTDYADSVKG (SEQ ID NO:3);
- (vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F15, wherein F1-F15 is VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); and
- 30 (b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NOs:1-18.
- In one aspect, an anti-DLL4 antibody of the invention comprises:
- (a) at least one, two, three, four or five hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of:

(i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 10)

(ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is SASFLYS (SEQ ID NO:11)

5 (iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQSYTGTVT (SEQ ID NO:18)

(iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1);

(v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is
10 GYISPNSGFTYYADSVKG (SEQ ID NO:8) and

(vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F15, wherein F1-F15 is VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); and

(b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NOs:1-18.

15 In one aspect, the invention provides an antibody comprising one, two, three, four, five or six HVRs, wherein each HVR comprises, consists or consists essentially of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-18, and wherein SEQ ID NO:10 corresponds to an HVR-L1, SEQ ID NO:11 corresponds to an HVR-L2, SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 17, or 18 correspond to an HVR-L3, SEQ ID NO:1 or 2 correspond
20 to an HVR-H1, SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 or 8 correspond to an HVR-H2, and SEQ ID NO:9 corresponds to an HVR-H3. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 12, 1, 3, 9. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3,
25 wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 13, 1, 4, 9. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 14, 2, 3, 9. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 15, 1,
30 5, 9. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 16, 1, 6, 9. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 17, 1, 7, 9. In one embodiment, an antibody of the

invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 18, 1, 8, 9.

Variant HVRs in an antibody of the invention can have modifications of one or more (such as two, three, four, five, or more) residues within the HVR.

5 In one embodiment, a HVR-L3 variant comprises 1-6 (1, 2, 3, 4, 5, or 6) substitutions in any combination of the following positions: 91 (S or W), 92 (Y or F), 93 (T, N or S), 94 (T or G), 95 (P, Q, A or T), and/or 96 (P, S, A, or V).

In one embodiment, a HVR-H2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3, or 4) substitutions in any combination of the following positions: 50 (V, L or Y), 52 (N or S), 52a (P or S), or
10 53 (N, Q, T, or I).

Letter(s) in parenthesis following each position indicates an illustrative substitution (i.e., replacement) amino acid; as would be evident to one skilled in the art, suitability of other amino acids as substitution amino acids in the context described herein can be routinely assessed using techniques known in the art and/or described herein.

15 In one aspect, the invention provides an antibody comprising a HVR-H1 region comprising the sequence of SEQ ID NO:1 or 2. In one aspect, the invention provides an antibody comprising a HVR-H2 region comprising the sequence of SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7, or 8. In one aspect, the invention provides an antibody comprising a HVR-H3 region comprising the sequence of SEQ ID NO: 9. In one embodiment, the invention provides an
20 antibody comprising a HVR-L1 region comprising the sequence of SEQ ID NO:10. In one embodiment, the invention provides an antibody comprising a HVR-L2 region comprising the sequence of SEQ ID NO: 11. In one embodiment, the invention provides an antibody comprising a HVR-L3 region comprising the sequence of SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, or 18.

25 In one aspect, the invention provides an antibody comprising at least one, at least two, or all three of the following:

- (i) a HVR-H1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:1;
- (ii) a HVR-H2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 5;
- (iii) a HVR-H3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 9.

30 In one aspect, the invention provides an antibody comprising at least one, at least two, or all three of the following:

- (i) a HVR-L1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 10;
- (ii) a HVR-L2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 11;
- (iii) a HVR-L3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 15.

In one aspect, the invention provides an antibody comprising at least one, at least two, or all three of the following:

- (i) a HVR-H1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 1;
- (ii) a HVR-H2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 8;
- 5 (iii) a HVR-H3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 9.

In one aspect, the invention provides an antibody comprising at least one, at least two, or all three of the following:

- (i) a HVR-L1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 10;
- (ii) a HVR-L2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 11;
- 10 (iii) a HVR-L3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO: 18.

The amino acid sequences of SEQ ID NOs: 1-18 are numbered with respect to individual HVR (i.e., H1, H2 or H3) as indicated in Figures 1a and 1b, the numbering being consistent with the Kabat numbering system as described below.

In one aspect, the invention provides antibodies comprising heavy chain HVR
15 sequences as depicted in Figures 1a and 1b.

In one aspect, the invention provides antibodies comprising light-chain HVR sequences as depicted in Figures 1a and 1b.

Some embodiments of antibodies of the invention comprise a light chain variable domain of humanized 4D5 antibody (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc.,
20 South San Francisco, CA, USA) (also referred to in U.S. Pat. No. 6,407,213 and Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93) as depicted in SEQ ID NO: 52 below.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val *Asn* Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
25 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
Ser *Arg* Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln *His* Tyr Thr Thr Pro Pro
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO:
52) (HVR residues are underlined)

30 In one embodiment, the huMAb4D5-8 light chain variable domain sequence is modified at one or more of positions 30, 66 and 91 (*Asn*, *Arg* and *His* as indicated in bold/italics above, respectively). In one embodiment, the modified huMAb4D5-8 sequence comprises Ser in position 30, Gly in position 66 and/or Ser in position 91. Accordingly, in one embodiment, an antibody of the invention comprises a

light chain variable domain comprising the sequence depicted in SEQ ID NO:53
below:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala
5 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
Ser **Gly** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro
10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO:
53) (HVR residues are underlined)

Substituted residues with respect to huMAb4D5-8 are indicated in bold/italics
above.

Antibodies of the invention can comprise any suitable framework variable domain
sequence, provided binding activity to DLL4 is substantially retained. For example, in
15 some embodiments, antibodies of the invention comprise a human subgroup III heavy
chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the
framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In
some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one
embodiment, these antibodies comprise heavy chain variable domain framework sequences
20 of huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (also
referred to in U.S. Pat. Nos. 6,407,213 & 5,821,337, and Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004),
340(5):1073-93). In one embodiment, these antibodies further comprise a human κ 1 light
chain framework consensus sequence. In one embodiment, these antibodies comprise light
chain HVR sequences of huMAb4D5-8 as described in U.S. Pat. Nos. 6,407,213 &
25 5,821,337.) In one embodiment, these antibodies comprise light chain variable domain
sequences of huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA,
USA) (also referred to in U.S. Pat. Nos. 6,407,213 & 5,821,337, and Lee et al., *J. Mol.*
Biol. (2004), 340(5):1073-93).

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable
30 domain, wherein the framework sequence comprises the sequence of SEQ ID NOS: 19, 20,
21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, and/or 37, and HVR H1, H2
and H3 sequences are SEQ ID NOS:1, 5, and/or 9, respectively. In one embodiment, an
antibody of the invention comprises a light chain variable domain, wherein the framework

sequence comprise the sequence of SEQ ID NOS: 38, 39, 40 and/or 41, and HVR L1, L2 and L3 sequences are SEQ ID NOS: 10, 11 and/or 15, respectively.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequence of SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, and/or 37, and HVR H1, H2 and H3 sequences are SEQ ID NOS: 2, 3, and/or 9, respectively. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain, wherein the framework sequence comprise the sequence of SEQ ID NOS: 38, 39, 40 and/or 41, and HVR L1, L2 and L3 sequences are SEQ ID NOS: 10, 11 and/or 14, respectively.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequence of SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, and/or 37, and HVR H1, H2 and H3 sequences are SEQ ID NOS: 1, 8 and/or 9, respectively. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain, wherein the framework sequence comprise the sequence of SEQ ID NOS: 38, 39, 40 and/or 41, and HVR L1, L2 and L3 sequences are SEQ ID NOS: 10, 11 and/or 18, respectively.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequence of SEQ ID NOS: 46, 47, 48, and/or 49, and HVR H1, H2 and H3 sequences are SEQ ID NOS: 1, 5, and/or 9, respectively. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain, wherein the framework sequence comprise the sequence of SEQ ID NOS: 42, 43, 44, and/or 45, and HVR L1, L2 and L3 sequences are SEQ ID NOS: 10, 11 and/or 15, respectively.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequence of SEQ ID NOS: 46, 47, 48, and/or 49, and HVR H1, H2 and H3 sequences are SEQ ID NOS: 2, 3, and/or 9, respectively. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain, wherein the framework sequence comprise the sequence of SEQ ID NOS: 42, 43, 44, and/or 45, and HVR L1, L2 and L3 sequences are SEQ ID NOS: 10, 11 and/or 14, respectively.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequence of SEQ ID NOS: 46, 47, 48, and/or 49, and HVR H1, H2 and H3 sequences are SEQ ID NOS: 1, 8, and/or 9, respectively. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain

variable domain, wherein the framework sequence comprise the sequence of SEQ ID NOS: 42, 43, 44, and/or 45, and HVR L1, L2 and L3 sequences are SEQ ID NOS: 10, 11 and/or 18, respectively.

In one embodiment, an antibody of the invention is affinity matured to obtain the target binding affinity desired. In one example, an affinity matured antibody of the invention comprises substitution at one or more of amino acid position H28, H30, H31, H32, H33, L91, L92, L93, L94, L95 and/or L96. In one example an affinity matured antibody of the invention comprises one or more of the following substitutions: (a) in the heavy chain, V50L, V50Y, N52S, P52aS, N53Q, N53T, N53I, S56A, S56F, T57S, D58E, D58I, D58A, D58Y, or (b), in the light chain, S91W, Y92F, T93N, T93S, T94G, P95Q, P95A, P95T, P96S, P96A, P96V.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:54. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:55. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:54 and a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:55.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:56. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:57. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:56 and a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:57.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:58. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:59. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:58 and a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:59.

In one aspect, the invention provides an antibody that competes with any of the above-mentioned antibodies for binding to DLL4. In one aspect, the invention provides an antibody that binds to the same epitope on DLL4 as any of the above-mentioned antibodies.

As is known in the art, and as described in greater detail hereinbelow, the amino acid position/boundary delineating a hypervariable region of an antibody can vary, depending on the context and the various definitions known in the art (as described below). Some positions within a variable domain may be viewed as hybrid hypervariable positions in that these positions can be deemed to be within a hypervariable region under one set of criteria while being deemed to be outside a hypervariable region under a different set of criteria. One or more of these positions can also be found in extended hypervariable regions (as further defined below).

In some embodiments, the antibody is a monoclonal antibody. In some embodiments, the antibody is a polyclonal antibody. In some embodiments, the antibody is selected from the group consisting of a chimeric antibody, an affinity matured antibody, a humanized antibody, and a human antibody. In some embodiments, the antibody is an antibody fragment. In some embodiments, the antibody is a Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, or scFv.

In one embodiment, the antibody is a chimeric antibody, for example, an antibody comprising antigen binding sequences from a non-human donor grafted to a heterologous non-human, human or humanized sequence (e.g., framework and/or constant domain sequences). In one embodiment, the non-human donor is a mouse. In one embodiment, an antigen binding sequence is synthetic, e.g. obtained by mutagenesis (e.g., phage display screening, etc.). In one embodiment, a chimeric antibody of the invention has murine V regions and human C region. In one embodiment, the murine light chain V region is fused to a human kappa light chain. In one embodiment, the murine heavy chain V region is fused to a human IgG1 C region.

Humanized antibodies of the invention include those that have amino acid substitutions in the FR and affinity maturation variants with changes in the grafted CDRs. The substituted amino acids in the CDR or FR are not limited to those present in the donor or recipient antibody. In other embodiments, the antibodies of the invention further comprise changes in amino acid residues in the Fc region that lead to improved effector function including enhanced CDC and/or ADCC function and B-cell killing. Other antibodies of the invention include those having specific changes that improve stability. In other embodiments, the antibodies of the invention comprise changes in amino acid residues in the Fc region that lead to decreased effector function, e.g. decreased CDC and/or ADCC function and/or decreased B-cell killing. In some embodiments, the antibodies of the invention are characterized by decreased binding (such as absence of

binding) to human complement factor C1q and/or human Fc receptor on natural killer (NK) cells. In some embodiments, the antibodies of the invention are characterized by decreased binding (such as the absence of binding) to human FcγRI, FcγRIIA, and/or FcγRIIIA. In some embodiments, the antibodies of the invention is of the IgG class (eg, IgG1 or IgG4) and comprises at least one mutation in E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 and/or P329 (numbering according to the EU index). In some embodiments, the antibodies comprise the mutation L234A/L235A or D265A/N297A.

In one aspect, the invention provides anti-DLL4 polypeptides comprising any of the antigen binding sequences provided herein, wherein the anti-DLL4 polypeptides specifically bind to DLL4.

The antibodies of the invention bind (such as specifically bind) DLL4, and in some embodiments, may modulate one or more aspects of DLL4-associated effects, including but not limited to any one or more of reduction or blocking of Notch receptor activation, reduction or blocking of Notch receptor downstream molecular signaling, disruption or blocking of Notch receptor binding to DLL4, and/or promotion of endothelial cell proliferation, and/or inhibition of endothelial cell differentiation, and/or inhibition of arterial differentiation, and/or inhibition of tumor vascular perfusion, and/or treatment and/or prevention of a tumor, cell proliferative disorder or a cancer; and/or treatment or prevention of a disorder associated with DLL4 expression and/or activity and/or treatment or prevention of a disorder associated with Notch receptor expression and/or activity. In some embodiments, the antibody of the invention specifically binds to DLL4. In some embodiments, the antibody specifically binds to the DLL4 extracellular domain (ECD). In some embodiments, the antibody specifically binds to a polypeptide consisting of or consisting essentially of the DLL4 extracellular domain. In some embodiments, the antibody specifically binds DLL4 with a KD of about 1 nM or better, or about 500 pM or better. In some embodiments, the antibody specifically binds human DLL4 with a k_{on} of about 2×10^5 or better, or about 1×10^5 or better. In some embodiments, the antibody of the invention reduces, inhibits, and/or blocks DLL4 activity in vivo and/or in vitro. In some embodiments, the antibody competes for binding with DLL4-ligand (reduces and/or blocks Notch receptor binding to DLL4).

In one aspect, the invention provides compositions comprising one or more antibodies of the invention and a carrier. In one embodiment, the carrier is pharmaceutically acceptable.

5 In one aspect, the invention provides nucleic acids encoding an anti-DLL4 antibody of the invention.

In one aspect, the invention provides vectors comprising a nucleic acid of the invention.

10 In one aspect, the invention provides compositions comprising one or more nucleic acid of the invention and a carrier. In one embodiment, the carrier is pharmaceutically acceptable.

In one aspect, the invention provides host cells comprising a nucleic acid or a vector of the invention. A vector can be of any type, for example a recombinant vector such as an expression vector. Any of a variety of host cells can be used. In one embodiment, a host cell is a prokaryotic cell, for example, *E. coli*. In one embodiment, a host cell is a eukaryotic cell, for example a mammalian cell such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cell.

20 In one aspect, the invention provides methods of making an antibody of the invention. For example, the invention provides methods of making an anti-DLL4 antibody (which, as defined herein includes full length and fragments thereof) or immunoconjugate, said method comprising expressing in a suitable host cell a recombinant vector of the invention encoding said antibody (or fragment thereof), and recovering said antibody.

In one aspect, the invention provides an article of manufacture comprising a container; and a composition contained within the container, wherein the composition comprises one or more anti-DLL4 antibodies of the invention. In one embodiment, the composition further comprises an anti-angiogenesis agent. In one embodiment the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF antibody, e.g., bevacizumab. In one embodiment, the composition comprises a nucleic acid of the invention. In one embodiment, a composition comprising an antibody further comprises a carrier, which in some embodiments is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a second composition is contained within the container, wherein the second composition comprises an anti-angiogenesis agent. In one embodiment, the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF antibody, e.g. bevacizumab. In one embodiment, an article of manufacture of the invention further comprises instructions for administering the composition(s) (for e.g., the antibody) to a subject (such as instructions for any of the methods described herein).

In one aspect, the invention provides a kit comprising a first container comprising a composition comprising one or more anti-DLL4 antibodies of the invention; and a second container comprising a buffer. In one embodiment, the buffer is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a composition comprising an antibody further comprises a carrier, which in some embodiments is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a kit further comprises instructions for administering the composition (for e.g., the antibody) to a subject.

In one aspect, the invention provides use of an anti-DLL4 antibody of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disorder, such as a cancer, a tumor, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the disorder is a pathological condition associated with angiogenesis.

In one aspect, the invention provides use of a nucleic acid of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disorder, such as a cancer, a tumor, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the disorder is a pathological condition associated with angiogenesis.

In one aspect, the invention provides use of an expression vector of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disorder, such as a cancer, a tumor, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the disorder is a pathological condition associated with angiogenesis.

In one aspect, the invention provides use of a host cell of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disorder, such as a cancer, a tumor, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the disorder is a pathological condition associated with angiogenesis.

In one aspect, the invention provides use of an article of manufacture of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disorder, such as a cancer, a tumor, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the disorder is a pathological condition associated with angiogenesis.

In one aspect, the invention provides use of a kit of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disorder, such as a cancer, a tumor, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the disorder is a pathological condition associated with angiogenesis.

The invention provides methods and compositions useful for modulating disease states associated with expression and/or activity of DLL4, such as increased or decreased expression and/or activity, or undesired expression and/or activity.

In one aspect, the invention provides methods for treating or preventing a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder associated with increased expression and/or activity of DLL4, the methods comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

5 In one aspect, the invention provides methods for reducing, inhibiting, blocking, or preventing growth of a tumor or cancer, the methods comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

In one aspect, the invention provides methods for treating a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder comprising administering an effective amount of an anti-DLL4
10 antibody to a subject in need of such treatment.

In one aspect, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

In one aspect, the invention provides methods for treating a pathological condition
15 associated with angiogenesis comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the pathological condition associated with angiogenesis is a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the pathological condition associated with angiogenesis is an intraocular neovascular disease.

20 Methods of the invention can be used to affect any suitable pathological state. Exemplary disorders are described herein, and include cancers selected from the group consisting of small cell lung cancer, neuroblastomas, melanoma, breast carcinoma, gastric cancer, colorectal cancer (CRC), and hepatocellular carcinoma, including metastatic forms of those cancers.

25 Methods of the invention can further comprise additional treatment steps. For example, in one embodiment, a method further comprises a step wherein a targeted cell and/or tissue (for e.g., a cancer cell) is exposed to radiation treatment or a chemotherapeutic agent or an anti-angiogenic agent.

In another aspect, the invention provides methods for detection of DLL4, the
30 methods comprising detecting DLL4-anti-DLL4 antibody complex in the sample. The term "detection" as used herein includes qualitative and/or quantitative detection (measuring levels) with or without reference to a control.

In another aspect, the invention provides methods for diagnosing a disorder associated with DLL4 expression and/or activity, the methods comprising detecting DLL4-

anti-DLL4 antibody complex in a biological sample from a patient having or suspected of having the disorder. In some embodiments, the DLL4 expression is increased expression or abnormal expression. In some embodiments, the disorder is a tumor, cancer, and/or a cell proliferative disorder.

5 In another aspect, the invention provides any of the anti-DLL4 antibodies described herein, wherein the anti-DLL4 antibody comprises a detectable label.

In another aspect, the invention provides a complex of any of the anti-DLL4 antibodies described herein and DLL4. In some embodiments, the complex is in vivo or in vitro. In some embodiments, the complex comprises a cancer cell. In some embodiments,
10 the anti-DLL4 antibody is detectably labeled.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGURE 1a, b: Heavy chain and light chain HVR loop sequences of anti-DLL4 antibodies. The figures show the heavy chain HVR sequences, H1, H2, and H3, and light
15 chain HVR sequences, L1, L2 and L3. Sequence numbering is as follows: clone 152.26 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:3; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID NO:11; HVR-L3 is SEQ ID NO:12); clone 152.26.6 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:4; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID NO:11; HVR-L3 is SEQ ID
20 NO:13); clone 152.26.14 (HVR-H1 is SEQ ID NO:2; HVR-H2 is SEQ ID NO:3; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID NO:11; HVR-L3 is SEQ ID NO:14); clone 152.26.20 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:5; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID NO:11; HVR-L3 is SEQ ID NO:15); clone 152.26.34 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:6; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID NO:11; HVR-L3 is SEQ ID NO:16); clone 152.26.40 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:7; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID NO:11; HVR-L3 is SEQ ID NO:17); and clone 152.26.82 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:8; HVR-H3 is SEQ ID NO:9; HVR-L1 is SEQ ID NO:10; HVR-L2 is SEQ ID
30 NO:11; HVR-L3 is SEQ ID NO:18).

Amino acid positions are numbered according to the Kabat numbering system as described below.

FIGURES 2 & 3: depict exemplary acceptor human consensus framework sequences for use in practicing the instant invention with sequence identifiers as follows:

Variable heavy (VH) consensus frameworks (FIG. 2a, b)

- human VH subgroup I consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:19)
human VH subgroup I consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:20-22)
- 5 human VH subgroup II consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:23)
human VH subgroup II consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:24-26)
human VH subgroup II consensus framework minus extended
human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:27)
- 10 human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:28-30)
human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:31)
human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:32-33)
- 15 human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:34)
human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:35-37)

Variable light (VL) consensus frameworks (FIG. 3)

- human VL kappa subgroup I consensus framework (SEQ ID NO:38)
- 20 human VL kappa subgroup II consensus framework (SEQ ID NO:39)
human VL kappa subgroup III consensus framework (SEQ ID NO:40)
human VL kappa subgroup IV consensus framework (SEQ ID NO:41)

FIGURE 4: depicts framework region sequences of huMAb4D5-8 light and heavy chains. Numbers in superscript/bold indicate amino acid positions according to Kabat.

- 25 FIGURE 5: depicts modified/variant framework region sequences of huMAb4D5-8 light and heavy chains. Numbers in superscript/bold indicate amino acid positions according to Kabat.

FIGURE 6: depicts the heavy chain variable regions and light chain variable regions of antibody clones 26.20, 26.14, and 26.82.

- 30 FIGURE 7: DLL4-mediated Notch signaling regulated EC proliferation. a-c, f, HUVEC sprouting assays in 3-D fibrin gels. Anti-DLL4 antibody (YW26.82) or DBZ promoted the sprouting of HUVECs (a). Ki67 staining showed that anti-DLL4 antibody or DBZ caused hyperproliferation of HUVECs (b). Anti-DLL4 antibody or DBZ increased the sprouting of HUVECs in the presence of SF conditioned medium (c). d, h, Systemic

24

delivery of anti-DLL4 antibody caused massive accumulation of ECs in neonatal retinas. Confocal images of low (top) and high magnification (bottom) of retinal vasculature (isoelectin staining) (d). Ki67 staining shows increased EC proliferation in the neonatal retinas treated with anti-DLL4 antibody (h). e, Notch activation by immobilized DLL4 inhibited HUVEC proliferation. f, Anti-VEGF antibody inhibited HUVEC sprouting in the presence or absence of DBZ. g, Regulation of VEGFR2 by Notch. Quantitative PCR analysis of VEGFR2 expression in response to, Notch blockade in 3-D fibrin gel culture of HUVECs (7 d) by anti-DLL4 antibody or DBZ (left), or Notch activation in 2-D culture of HUVECs (36 hr) by immobilized DLL4 (right). Anti-DLL4 antibody and DBZ were used at 5 μ g/ml and 0.08 μ M, respectively (a-c, e-g).

FIGURE 8: DLL4-mediated Notch signaling regulated EC differentiation. a, The lumen-like structures (white arrows) formed by HUVECs growing in fibrin gels were lost in the presence of anti-DLL4 antibody or DBZ. Instead, the spouts were highly packed with cells (black arrows). b, Regulation of TGF β 2 by Notch. Quantitative PCR analysis of TGF β 2 expression in response to, Notch blockade in 3-D fibrin gel culture of HUVECs for (7 d) by anti-DLL4 antibody or DBZ (left), or Notch activation in 2-D culture of HUVECs (36 hr) by immobilized DLL4 (right). c, Anti-DLL4 antibody blocks arterial development. Confocal images of neonatal mouse retinas stained with alpha smooth muscle actin (ASMA) and isoelectin. Neonatal mice were treated as described in Fig. 1d. d, Confocal images of adult mouse retinas stained with ASMA and isoelectin. 8 week-old mice were treated with PBS or anti-DLL4 antibody (10 mg/kg, twice weekly) for two weeks.

FIGURE 9: Selective blocking of DLL4 and/or VEGF disrupted tumor angiogenesis and inhibits tumor growth. a-f, Results of tumor models: HM7 (a), Colo205 (b), Calu6 (c), MDA-MB-435 (d), MV-522 (e) and WEHI3 (f). Mean tumor volumes with SEs are presented. g-h, Tumor vascular histology studies. Immunohistochemistry of anti-CD31 in EL4 tumor sections from control, anti-DLL4 antibody and anti-VEGF treated mice (g). Lectin perfusion and anti-CD31 staining in EL4 tumor sections (h). i-p. Results of tumor models SK-OV-3X1 (i), LL2 (j), EL4 (k), H1299 (l), SKMES-1(m), MX-1(n), SW620 (o) and LS174T(p).

FIGURE 10: DLL4/Notch was dispensable in the homeostasis of mouse intestine. Immunohistochemical studies of small intestines from control (a, d, g, j), anti-DLL4 antibody (10 mg/kg, twice weekly for 6 weeks) (b, e, h, k), and DBZ treated (30 μ mol/kg daily for 5 days) (c, f, i, l) mice. As shown by H&E (a, b, c) and Alcian Blue staining (d, e, f), DBZ caused replacement of the TA population by goblet cells. This change was entirely

absent from anti-DLL4 antibody treatment. Ki67 (g, h, i) and HES-1 (j, k, l) staining further confirmed that anti-DLL4 antibody failed to replicate the effect of DBZ.

FIGURE 11: Characterization of anti-DLL4 antibody. a, Epitope mapping of anti-DLL4 antibody monoclonal antibody (Mab) YW26.82. Schematic representation of a set of DLL4 mutants expressed as C-terminal human placental alkaline phosphatase (AP) fusion proteins. 293T cell conditioned media containing the fusion proteins were tested on 96-well microtiter plates coated with purified anti-DLL4 antibody (YW26.82, 0.5 µg/ml). The bound DLL4.AP was detected using 1-Step PNPP (Pierce) as substrate and OD 405 nm absorbance measurement. b-d, Selective binding of YW26.82 to DLL4. 96-well Nunc MaxiSorp™ plates were coated with purified recombinant proteins as indicated (1 µg/ml). The binding of YW26.82 at indicated concentrations was measured by ELISA assay. Bound antibodies were detected with anti-human antibody HRP conjugate using TMB as substrate and OD 450 nm absorbance measurement. Anti-HER2 and recombinant ErbB2-ECD were used as assay control (b). FACS analysis of 293 cells transiently transfected with vector, full length DLL4, Jag1 or DLL1. Significant binding of YW26.82 was only detected on DLL4 transfected cells (top panel). Expression of Jag1 and DLL1 was confirmed by the binding of recombinant rat Notch1-Fc (rrNotch1-Fc, middle panel) and recombinant rat Notch2-Fc (rrNotch2-Fc, bottom panel), respectively. YW26.82, rrNotch1-Fc or rrNotch2-Fc (R&D system) were used at 2 µg/ml followed by goat anti-human IgG-PE (1:500, Jackson ImmunoResearch) (c). Anti-DLL4 antibody blocked the binding of DLL4-AP, but not DLL1-AP, to coated rNotch1, with a calculated IC50 of ~12 nM (left panel). Anti-DLL4 antibody blocked the binding of DLL4-His, but not Jag1-His, to coated rNotch1, with a calculated IC50 of ~8 nM (right panel) (d). e, Specific binding of YW26.82 to endogenously expressed DLL4. FACS analysis of HUVECs transfected with control or DLL4-specific siRNA. YW26.82 was used at 2 µg/ml, followed by goat anti-human IgG-PE (1:500, Jackson ImmunoResearch) (e).

FIGURE 12: Upregulation of DLL4 by Notch activation. HUVECs were stimulated by immobilized C-terminal His-tagged human DLL4 (amino acids 1-404) in the absence or presence of DBZ (0.08 µM). 36 hr after stimulation, endogenous DLL4 expression was examined by FACS analysis with anti-DLL4 antibody.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention herein provides anti-DLL4 antibodies, that are useful for, e.g., treatment or prevention of disease states associated with expression and/or activity of DLL4, such as increased expression and/or activity or undesired expression and/or activity.

- 5 In some embodiments, the antibodies of the invention are used to treat a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the antibodies of the invention are used to treat a pathological condition associated with angiogenesis.

In another aspect, the anti-DLL4 antibodies of the invention find utility as reagents for detection and/or isolation of DLL4, such as detection of DLL4 in various tissues and
10 cell type.

The invention further provides methods of making anti-DLL4 antibodies, and polynucleotides encoding anti-DLL4 antibodies.

General techniques

- The techniques and procedures described or referenced herein are generally well
15 understood and commonly employed using conventional methodology by those skilled in the art, such as, for example, the widely utilized methodologies described in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series METHODS IN
20 ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definitions

- 25 An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to
30 greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie™ blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes

29

the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Similarly, isolated antibody includes the antibody in medium around recombinant cells. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

5 An "isolated" nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the antibody nucleic acid. An isolated nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in
10 natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the antibody where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

 The term "variable domain residue numbering as in Kabat" or "amino acid position numbering as in Kabat", and variations thereof, refers to the numbering system used for
15 heavy chain variable domains or light chain variable domains of the compilation of antibodies in Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Using this numbering system, the actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids corresponding to a shortening of, or insertion into, a FR or CDR of the
20 variable domain. For example, a heavy chain variable domain may include a single amino acid insert (residue 52a according to Kabat) after residue 52 of H2 and inserted residues (e.g. residues 82a, 82b, and 82c, etc according to Kabat) after heavy chain FR residue 82. The Kabat numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment at regions of homology of the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered
25 sequence.

 The phrase "substantially similar," or "substantially the same", as used herein, denotes a sufficiently high degree of similarity between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that one of skill in the art would consider the
30 difference between the two values to be of little or no biological and/or statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (e.g., Kd values). The difference between said two values is preferably less than about 50%, preferably less than about 40%, preferably less than about 30%, preferably less than

about 20%, preferably less than about 10% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

“Binding affinity” generally refers to the strength of the sum total of noncovalent interactions between a single binding site of a molecule (e.g., an antibody) and its binding partner (e.g., an antigen). Unless indicated otherwise, as used herein, “binding affinity” refers to intrinsic binding affinity which reflects a 1:1 interaction between members of a binding pair (e.g., antibody and antigen). The affinity of a molecule X for its partner Y can generally be represented by the dissociation constant (K_d). Affinity can be measured by common methods known in the art, including those described herein. Low-affinity antibodies generally bind antigen slowly and tend to dissociate readily, whereas high-affinity antibodies generally bind antigen faster and tend to remain bound longer. A variety of methods of measuring binding affinity are known in the art, any of which can be used for purposes of the present invention. Specific illustrative embodiments are described in the following.

In one embodiment, the “ K_d ” or “ K_d value” according to this invention is measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of an antibody of interest and its antigen as described by the following assay that measures solution binding affinity of Fabs for antigen by equilibrating Fab with a minimal concentration of (^{125} I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). To establish conditions for the assay, microtiter plates (Dynex) are coated overnight with 5 ug/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbant plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [^{125} I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (e.g., consistent with assessment of an anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (e.g., 65 hours) to insure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature (e.g., for one hour). The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% Tween@20 in PBS. When the plates have dried, 150 μ l/well of scintillant (MicroScint™-20; Packard) is added, and the plates are counted on a TopCount gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are

chosen for use in competitive binding assays. According to another embodiment the K_d or K_d value is measured by using surface plasmon resonance assays using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5 µg/ml (~0.2 µM) before injection at a flow rate of 5 µl/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween®20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25 µl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) is calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. If the on-rate exceeds $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stir red cuvette.

An "on-rate" or "rate of association" or "association rate" or " k_{on} " according to this invention can also be determined with the same surface plasmon resonance technique described above using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5 µg/ml (~0.2 µM) before injection at a flow rate of 5 µl/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are

injected in PBS with 0.05% Tween@20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25µl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. However, if the on-rate exceeds $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate is preferably determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette.

The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a phage vector. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "recombinant vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may, at times, be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector.

"Polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, 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, or by a synthetic reaction. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide

structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after synthesis, such as by conjugation with a label. Other types of modifications include, for example, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid or semi-solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, alpha-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and a basic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S("thioate"), P(S)S ("dithioate"), "(O)NR₂" ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂ ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

"Oligonucleotide," as used herein, generally refers to short, generally single stranded, generally synthetic polynucleotides that are generally, but not necessarily, less than about 200 nucleotides in length. The terms "oligonucleotide" and "polynucleotide"

are not mutually exclusive. The description above for polynucleotides is equally and fully applicable to oligonucleotides.

“Percent (%) amino acid sequence identity” with respect to a peptide or polypeptide sequence is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific peptide or polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or MegAlign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program’s alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino

acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the
5 ALIGN-2 computer program.

The term "DLL4" (interchangeably termed "delta-like 4"), as used herein, refers, unless specifically or contextually indicated otherwise, to any native or variant (whether native or synthetic) DLL4 polypeptide. The term "native sequence" specifically encompasses naturally occurring truncated or secreted forms (e.g., an extracellular domain
10 sequence), naturally occurring variant forms (e.g., alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants. The term "wild type DLL4" generally refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of a naturally occurring DLL4 protein. The term "wild type DLL4 sequence" generally refers to an amino acid sequence found in a naturally occurring DLL4.

15 The term "Notch receptor" (interchangeably termed "Notch"), as used herein, refers, unless specifically or contextually indicated otherwise, to any native or variant (whether native or synthetic) Notch receptor polypeptide. Humans have four Notch receptors (Notch1, Notch 2, Notch3, and Notch4). As used herein, the term Notch receptor includes any one of or all four human Notch receptors. The term "native sequence"
20 specifically encompasses naturally occurring truncated or secreted forms (e.g., an extracellular domain sequence), naturally occurring variant forms (e.g., alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants. The term "wild type Notch receptor" generally refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of a naturally occurring Notch receptor protein. The term "wild type Notch receptor sequence"
25 generally refers to an amino acid sequence found in a naturally occurring Notch receptor.

The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably in the broadest sense and include monoclonal antibodies (e.g., full length or intact monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multivalent antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies so long as they exhibit the desired biological activity) and may also
30 include certain antibody fragments (as described in greater detail herein). An antibody can be human, humanized and/or affinity matured.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly

34

distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called complementarity-determining regions (CDRs) or hypervariable regions (HVRs) both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework (FR). The variable

5 domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*,

10 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments,

15 called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-

20 recognition and -binding site. In a two-chain Fv species, this region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. In a single-chain Fv species, one heavy- and one light-chain variable domain can be covalently linked by a flexible peptide linker such that the light and heavy chains can associate in a "dimeric" structure analogous to that in a two-chain Fv species. It is in this configuration

25 that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the VH-VL dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

30 The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a

31

free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

5 The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these can be further
10 divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, and IgA₂. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

"Antibody fragments" comprise only a portion of an intact antibody, wherein the
15 portion preferably retains at least one, preferably most or all, of the functions normally associated with that portion when present in an intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. In one embodiment, an antibody fragment comprises an antigen binding site of
20 the intact antibody and thus retains the ability to bind antigen. In another embodiment, an antibody fragment, for example one that comprises the Fc region, retains at least one of the biological functions normally associated with the Fc region when present in an intact antibody, such as FcRn binding, antibody half life modulation, ADCC function and complement binding. In one embodiment, an antibody fragment is a monovalent antibody
25 that has an *in vivo* half life substantially similar to an intact antibody. For e.g., such an antibody fragment may comprise an antigen binding arm linked to an Fc sequence capable of conferring *in vivo* stability to the fragment.

36

The term "hypervariable region", "HVR", or "HV", when used herein refers to the regions of an antibody variable domain which are hypervariable in sequence and/or form structurally defined loops. Generally, antibodies comprise six hypervariable regions; three in the VH (H1, H2, H3), and three in the VL (L1, L2, L3). A number of hypervariable region delineations are in use and are encompassed herein. The Kabat Complementarity Determining Regions (CDRs) are based on sequence variability and are the most commonly used (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). The AbM hypervariable regions represent a compromise between the Kabat CDRs and Chothia structural loops, and are used by Oxford Molecular's AbM antibody modeling software. The "contact" hypervariable regions are based on an analysis of the available complex crystal structures. The residues from each of these hypervariable regions are noted below.

15		Loop Kabat	AbM	Chothia	Contact
		-----	---	-----	-----
		L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
		L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
		L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
20		H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
		(Kabat Numbering)			
		H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
		(Chothia Numbering)			
		H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
25		H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Hypervariable regions may comprise "extended hypervariable regions" as follows: 24-36 or 24-34 (L1), 46-56 or 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the VL and 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102 or 95-102 (H3) in the VH. The variable domain residues are numbered according to Kabat *et al.*, *supra* for each of these definitions.

"Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies

35

comprising the population are identical and/or bind the same epitope(s), except for possible variants that may arise during production of the monoclonal antibody, such variants generally being present in minor amounts. Such monoclonal antibody typically includes an antibody comprising a polypeptide sequence that binds a target, wherein the target-binding polypeptide sequence was obtained by a process that includes the selection of a single target binding polypeptide sequence from a plurality of polypeptide sequences. For example, the selection process can be the selection of a unique clone from a plurality of clones, such as a pool of hybridoma clones, phage clones or recombinant DNA clones. It should be understood that the selected target binding sequence can be further altered, for example, to improve affinity for the target, to humanize the target binding sequence, to improve its production in cell culture, to reduce its immunogenicity *in vivo*, to create a multispecific antibody, etc., and that an antibody comprising the altered target binding sequence is also a monoclonal antibody of this invention. In contrast to polyclonal antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody of a monoclonal antibody preparation is directed against a single determinant on an antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibody preparations are advantageous in that they are typically uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by a variety of techniques, including, for example, the hybridoma method (e.g., Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567), phage display technologies (see, e.g., Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); and Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), and technologies for producing human or human-like antibodies in animals that have parts or all of the human immunoglobulin loci or genes encoding human immunoglobulin sequences (see, e.g., WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551

(1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (all of GenPharm); 5,545,807; WO 1997/17852; U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally will also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). See also the following review articles and references cited therein: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

"Chimeric" antibodies (immunoglobulins) have a portion of the heavy and/or light chain identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological

activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Humanized antibody as used herein is a subset of chimeric antibodies.

5 "Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the scFv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv see Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

10 An "antigen" is a predetermined antigen to which an antibody can selectively bind. The target antigen may be polypeptide, carbohydrate, nucleic acid, lipid, hapten or other naturally occurring or synthetic compound. Preferably, the target antigen is a polypeptide.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH - VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

20 A "human antibody" is one which possesses an amino acid sequence which corresponds to that of an antibody produced by a human and/or has been made using any of the techniques for making human antibodies as disclosed herein. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human antigen-binding residues.

25 An "affinity matured" antibody is one with one or more alterations in one or more CDRs thereof which result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody which does not possess those alteration(s). 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. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

40

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody, and vary with the antibody isotype. Examples of antibody effector functions include: C1q binding and complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.* B cell receptor); and B cell activation.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" or "ADCC" refers to a form of cytotoxicity in which secreted Ig bound onto Fc receptors (FcRs) present on certain cytotoxic cells (*e.g.* Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) enable these cytotoxic effector cells to bind specifically to an antigen-bearing target cell and subsequently kill the target cell with cytotoxins. The antibodies "arm" the cytotoxic cells and are absolutely required for such killing. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 or Presta U.S. Patent No. 6,737,056 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998).

"Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source, *e.g.* from blood.

"Fc receptor" or "FcR" describes a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ

primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see review M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinetic, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) and regulates homeostasis of immunoglobulins. WO00/42072 (Presta) describes antibody variants with improved or diminished binding to FcRs. The content of that patent publication is specifically incorporated herein by reference. See, also, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Methods of measuring binding to FcRn are known (see, e.g., Ghetie 1997, Hinton 2004). Binding to human FcRn *in vivo* and serum half life of human FcRn high affinity binding polypeptides can be assayed, e.g., in transgenic mice or transfected human cell lines expressing human FcRn, or in primates administered with the Fc variant polypeptides.

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the lysis of a target cell in the presence of complement. Activation of the classical complement pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to antibodies (of the appropriate subclass) which are bound to their cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

Polypeptide variants with altered Fc region amino acid sequences and increased or decreased C1q binding capability are described in US patent No. 6,194,551B1 and WO99/51642. The contents of those patent publications are specifically incorporated herein by reference. See, also, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

The term "Fc region-comprising polypeptide" refers to a polypeptide, such as an antibody or immunoadhesin (see definitions below), which comprises an Fc region. The C-terminal lysine (residue 447 according to the EU numbering system) of the Fc region may be removed, for example, during purification of the polypeptide or by recombinant

engineering the nucleic acid encoding the polypeptide. Accordingly, a composition comprising a polypeptide having an Fc region according to this invention can comprise polypeptides with K447, with all K447 removed, or a mixture of polypeptides with and without the K447 residue.

- 5 A “blocking” antibody or an “antagonist” antibody is one which inhibits or reduces biological activity of the antigen it binds. Preferred blocking antibodies or antagonist antibodies substantially or completely inhibit the biological activity of the antigen.

An “agonist antibody”, as used herein, is an antibody which mimics at least one of the functional activities of a polypeptide of interest.

- 10 An “acceptor human framework” for the purposes herein is a framework comprising the amino acid sequence of a VL or VH framework derived from a human immunoglobulin framework, or from a human consensus framework. An acceptor human framework “derived from” a human immunoglobulin framework or human consensus framework may comprise the same amino acid sequence thereof, or may contain pre-
15 existing amino acid sequence changes. Where pre-existing amino acid changes are present, preferably no more than 5 and preferably 4 or less, or 3 or less, pre-existing amino acid changes are present. Where pre-existing amino acid changes are present in a VH, preferably those changes are only at three, two or one of positions 71H, 73H and 78H; for instance, the amino acid residues at those positions may be 71A, 73T and/or 78A. In one
20 embodiment, the VL acceptor human framework is identical in sequence to the VL human immunoglobulin framework sequence or human consensus framework sequence.

- A “human consensus framework” is a framework which represents the most commonly occurring amino acid residue in a selection of human immunoglobulin VL or VH framework sequences. Generally, the selection of human immunoglobulin VL or VH
25 sequences is from a subgroup of variable domain sequences. Generally, the subgroup of sequences is a subgroup as in Kabat *et al.* In one embodiment, for the VL, the subgroup is subgroup kappa I as in Kabat *et al.* In one embodiment, for the VH, the subgroup is subgroup III as in Kabat *et al.*

A "VH subgroup III consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable heavy subgroup III of Kabat *et al.* In one embodiment, the VH subgroup III consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences:

- 5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-WVRQAPGKGLEWV
(SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-
H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

A "VL subgroup I consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable light kappa subgroup I of Kabat *et al.*

- 10 In one embodiment, the VH subgroup I consensus framework amino acid sequence
comprises at least a portion or all of each of the following sequences:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ
ID NO:47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48)-L3-
FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:49).

- 15 A "disorder" or "disease" is any condition that would benefit from treatment with a
substance/molecule or method of the invention. This includes chronic and acute disorders
or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the
disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include
malignant and benign tumors; carcinoma, blastoma, and sarcoma.

- 20 The terms "cell proliferative disorder" and "proliferative disorder" refer to
disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one
embodiment, the cell proliferative disorder is cancer.

- "Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation,
whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues. The
25 terms "cancer", "cancerous", "cell proliferative disorder", "proliferative disorder" and
"tumor" are not mutually exclusive as referred to herein.

- The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition
in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth/proliferation.
Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma,
30 sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell
cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung,
squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer,
gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer,
liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer,

Vy

endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, gastric cancer, melanoma, and various types of head and neck cancer. Dysregulation of angiogenesis can lead to many disorders that can be treated by compositions and methods of the invention.

- 5 These disorders include both non-neoplastic and neoplastic conditions. Neoplastics include but are not limited those described above. Non-neoplastic disorders include but are not limited to undesired or aberrant hypertrophy, arthritis, rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, psoriatic plaques, sarcoidosis, atherosclerosis, atherosclerotic plaques, diabetic and other proliferative retinopathies including retinopathy of prematurity, retrolental
- 10 fibroplasia, neovascular glaucoma, age-related macular degeneration, diabetic macular edema, corneal neovascularization, corneal graft neovascularization, corneal graft rejection, retinal/choroidal neovascularization, neovascularization of the angle (rubcosis), ocular neovascular disease, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease),
- 15 corneal and other tissue transplantation, chronic inflammation, lung inflammation, acute lung injury/ARDS, sepsis, primary pulmonary hypertension, malignant pulmonary effusions, cerebral edema (e.g., associated with acute stroke/ closed head injury/ trauma), synovial inflammation, pannus formation in RA, myositis ossificans, hypertrophic bone formation, osteoarthritis (OA), refractory ascites, polycystic ovarian disease,
- 20 endometriosis, 3rd spacing of fluid diseases (pancreatitis, compartment syndrome, burns, bowel disease), uterine fibroids, premature labor, chronic inflammation such as IBD (Crohn's disease and ulcerative colitis), renal allograft rejection, inflammatory bowel disease, nephrotic syndrome, undesired or aberrant tissue mass growth (non-cancer), hemophilic joints, hypertrophic scars, inhibition of hair growth, Osler-Weber syndrome,
- 25 pyogenic granuloma retrolental fibroplasias, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, synovitis, dermatitis, preeclampsia, ascites, pericardial effusion (such as that associated with pericarditis), and pleural effusion.

- As used herein, "treatment" refers to clinical intervention in an attempt to alter the natural course of the individual or cell being treated, and can be performed either for
- 30 prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the

disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, antibodies of the invention are used to delay development of a disease or disorder.

An "individual" is a vertebrate, preferably a mammal, more preferably a human. Mammals include, but are not limited to, farm animals (such as cows), sport animals, pets
5 (such as cats, dogs and horses), primates, mice and rats.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows, *etc.* Preferably, the mammal is human.

An "effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of
10 time necessary, to achieve the desired therapeutic or prophylactic result.

A "therapeutically effective amount" of a substance/molecule of the invention, agonist or antagonist may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the substance/molecule, agonist or antagonist to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in
15 which any toxic or detrimental effects of the substance/molecule, agonist or antagonist are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically but not necessarily, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically
20 effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents e.g. methotrexate, adriamycin, vinca
25 alkaloids (vincristine, vinblastine, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents, enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes, antibiotics, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof, and the various antitumor or anticancer agents disclosed below.
30 Other cytotoxic agents are described below. A tumoricidal agent causes destruction of tumor cells.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and CYTOXAN® cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and

46

piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa;
ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine,
triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolmelamine;
acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol
5 (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a
camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11
(irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scopolctin, and 9-
aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin
and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide;
10 cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin
(including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratiastatin;
a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine,
cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide
hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil
15 mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine,
and ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e. g., calicheamicin,
especially calicheamicin gamma11 and calicheamicin omega11 (see, e.g., Agnew, Chem
Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin;
as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antibiotic
20 chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins,
cactinomycin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycinis, dactinomycin,
daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, ADRIAMYCIN® doxorubicin
(including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-
doxorubicin and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin,
25 mitomycins such as mitomycin C, 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-
30 mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine,
azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine,
floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitioestanol,
mepitioestane, testolactone; anti- adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane;
folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside;

Ux

- aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); thiotepa; taxoids, e.g., TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ Cremophor-free, albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), and TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chloranbucil; gemcitabine (GEMZAR®); 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine (VELBAN®); platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovin; vinorelbine (NAVELBINE®); novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; capecitabine (XELODA®); pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovovin.
- Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer, and are often in the form of systemic, or whole-body treatment. They may be hormones themselves. Examples include anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON® toremifene; anti-progesterones; estrogen receptor down-regulators (ERDs); agents that function to suppress or shut down the ovaries, for example, leutinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists such as LUPRON® and ELIGARD® leuprolide acetate, goserelin acetate, buserelin acetate and triptorelin; other

anti-androgens such as flutamide, nilutamide and bicalutamide; and aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, MEGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestane, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole, and ARIMIDEX® anastrozole. In addition, such definition of

5 chemotherapeutic agents includes bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), DIDROCAL® etidronate, NE-58095, ZOMETA® zoledronic acid/zoledronate, FOSAMAX® alendronate, AREDIA® pamidronate, SKELID® tiludronate, or ACTONEL® risedronate; as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane

10 nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC- α , Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R); vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine;

15 LURTOTECAN® topoisomerase I inhibitor; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosylate (an ErbB-2 and EGFR dual tyrosine kinase small-molecule inhibitor also known as GW572016); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition

20 which inhibits growth of a cell (such as a cell expressing DLL4) either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of cells (such as a cell expressing DLL4) in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the

25 vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in The Molecular Basis of

30 Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers

Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

“Doxorubicin” is an anthracycline antibiotic. The full chemical name of
5 doxorubicin is (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-
7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-
naphthacenedione.

The term “anti-neoplastic composition” refers to a composition useful in treating cancer comprising at least one active therapeutic agent, e.g., “anti-cancer agent”.
10 Examples of therapeutic agents (anti-cancer agents, also termed “anti-neoplastic agent” herein) include, but are limited to, e.g., chemotherapeutic agents, growth inhibitory agents, cytotoxic agents, agents used in radiation therapy, anti-angiogenesis agents, apoptotic agents, anti-tubulin agents, toxins, and other-agents to treat cancer, e.g., anti-VEGF neutralizing antibody, VEGF antagonist, anti-HER-2, anti-CD20, an epidermal growth
15 factor receptor (EGFR) antagonist (e.g., a tyrosine kinase inhibitor), HER1/EGFR inhibitor, erlotinib, a COX-2 inhibitor (e.g., celecoxib), interferons, cytokines, antagonists (e.g., neutralizing antibodies) that bind to one or more of the ErbB2, ErbB3, ErbB4, or VEGF receptor(s), inhibitors for receptor tyrosine kinases for platelet-derived growth factor (PDGF) and/or stem cell factor (SCF) (e.g., imatinib mesylate (Gleevec® Novartis)),
20 TRAIL/Apo2L, and other bioactive and organic chemical agents, etc.

The term “prodrug” as used in this application refers to a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into the more active parent form. See, e.g., Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”
25 Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). The prodrugs of this invention include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino
30 acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, beta-lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic

SD

drugs that can be derivatized into a prodrug form for use in this invention include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

An "anti-angiogenesis agent" or "angiogenesis inhibitor" refers to a small molecular weight substance, a polynucleotide (including, e.g., an inhibitory RNA (RNAi or siRNA)), a polypeptide, an isolated protein, a recombinant protein, an antibody, or conjugates or fusion proteins thereof, that inhibits angiogenesis, vasculogenesis, or undesirable vascular permeability, either directly or indirectly. For example, an anti-angiogenesis agent is an antibody or other antagonist to an angiogenic agent as defined above, e.g., antibodies to VEGF, antibodies to VEGF receptors, soluble VEGF receptor fragments or small molecules that block VEGF receptor signaling (e.g., PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (sunitinib malate), AMG706, or those described in, e.g., international patent application WO 2004/113304). Anti-angiogenesis agents also include native angiogenesis inhibitors, e.g., angiostatin, endostatin, etc. See, e.g., Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (e.g., Table 3 listing anti-angiogenic therapy in malignant melanoma); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (e.g., Table 2 listing antiangiogenic factors); and, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (e.g., Table 1 lists Anti-angiogenic agents used in clinical trials).

20 *Compositions of the invention and methods of making same*

This invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising an anti-DLL4 antibody; and polynucleotides comprising sequences encoding an anti-DLL4 antibody. As used herein, compositions comprise one or more antibodies that bind to DLL4, and/or one or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more antibodies that bind to DLL4. These compositions may further comprise suitable carriers, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

The invention also encompasses isolated antibody and polynucleotide embodiments. The invention also encompasses substantially pure antibody and polynucleotide embodiments.

The anti-DLL4 antibodies of the invention are preferably monoclonal. Also encompassed within the scope of the invention are Fab, Fab', Fab'-SH and F(ab')₂ fragments of the anti-DLL4 antibodies provided herein. These antibody fragments can be created by traditional means, such as enzymatic digestion, or may be generated by

recombinant techniques. Such antibody fragments may be chimeric or humanized. These fragments are useful for the diagnostic and therapeutic purposes set forth below.

Monoclonal antibodies are obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are
 5 identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies.

The anti-DLL4 monoclonal antibodies of the invention can be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, **256**:495 (1975), or may be
 10 made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Antibodies to DLL4 generally are raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip)
 15 injections of DLL4 and an adjuvant. DLL4 may be prepared using methods well-known in the art, some of which are further described herein. For example, recombinant production of DLL4 is described below. In one embodiment, animals are immunized with a derivative of DLL4 that contains the extracellular domain (ECD) of DLL4 fused to the Fc portion of an immunoglobulin heavy chain. In a preferred embodiment, animals are immunized with
 20 an DLL4-IgG1 fusion protein. Animals ordinarily are immunized against immunogenic conjugates or derivatives of DLL4 with monophosphoryl lipid A (MPL)/trehalose dicrynomycolate (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) and the solution is injected intradermally at multiple sites. Two weeks later the animals are boosted. 7 to 14 days later animals are bled and the serum is assayed for anti-DLL4 titer.
 25 Animals are boosted until titer plateaus.

Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

30 The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the

12

culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, **133**:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against DLL4. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, **107**:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The anti-DLL4 antibodies of the invention can be made by using combinatorial libraries to screen for synthetic antibody clones with the desired activity or activities. In principle, synthetic antibody clones are selected by screening phage libraries containing phage that display various fragments of antibody variable region (Fv) fused to phage coat protein. Such phage libraries are panned by affinity chromatography against the desired

antigen. Clones expressing Fv fragments capable of binding to the desired antigen are adsorbed to the antigen and thus separated from the non-binding clones in the library. The binding clones are then eluted from the antigen, and can be further enriched by additional cycles of antigen adsorption/elution. Any of the anti-DLL4 antibodies of the invention can be obtained by designing a suitable antigen screening procedure to select for the phage clone of interest followed by construction of a full length anti-DLL4 antibody clone using the Fv sequences from the phage clone of interest and suitable constant region (Fc) sequences described in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

The antigen-binding domain of an antibody is formed from two variable (V) regions of about 110 amino acids, one each from the light (VL) and heavy (VH) chains, that both present three hypervariable loops or complementarity-determining regions (CDRs). Variable domains can be displayed functionally on phage, either as single-chain Fv (scFv) fragments, in which VH and VL are covalently linked through a short, flexible peptide, or as Fab fragments, in which they are each fused to a constant domain and interact non-covalently, as described in Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, **12**: 433-455 (1994). As used herein, scFv encoding phage clones and Fab encoding phage clones are collectively referred to as "Fv phage clones" or "Fv clones".

Repertoires of VH and VL genes can be separately cloned by polymerase chain reaction (PCR) and recombined randomly in phage libraries, which can then be searched for antigen-binding clones as described in Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, **12**: 433-455 (1994). Libraries from immunized sources provide high-affinity antibodies to the immunogen without the requirement of constructing hybridomas. Alternatively, the naive repertoire can be cloned to provide a single source of human antibodies to a wide range of non-self and also self antigens without any immunization as described by Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, **12**: 725-734 (1993). Finally, naive libraries can also be made synthetically by cloning the unrearranged V-gene segments from stem cells, and using PCR primers containing random sequence to encode the highly variable CDR3 regions and to accomplish rearrangement in vitro as described by Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**: 381-388 (1992).

Filamentous phage is used to display antibody fragments by fusion to the minor coat protein pIII. The antibody fragments can be displayed as single chain Fv fragments, in which VH and VL domains are connected on the same polypeptide chain by a flexible polypeptide spacer, e.g. as described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**: 581-597 (1991), or

54

as Fab fragments, in which one chain is fused to pIII and the other is secreted into the bacterial host cell periplasm where assembly of a Fab-coat protein structure which becomes displayed on the phage surface by displacing some of the wild type coat proteins, e.g. as described in Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **19**: 4133-4137 (1991).

5 In general, nucleic acids encoding antibody gene fragments are obtained from immune cells harvested from humans or animals. If a library biased in favor of anti-DLL4 clones is desired, the subject is immunized with DLL4 to generate an antibody response, and spleen cells and/or circulating B cells other peripheral blood lymphocytes (PBLs) are recovered for library construction. In a preferred embodiment, a human antibody gene
10 fragment library biased in favor of anti-DLL4 clones is obtained by generating an anti-DLL4 antibody response in transgenic mice carrying a functional human immunoglobulin gene array (and lacking a functional endogenous antibody production system) such that DLL4 immunization gives rise to B cells producing human antibodies against DLL4. The generation of human antibody-producing transgenic mice is described below.

15 Additional enrichment for anti-DLL4 reactive cell populations can be obtained by using a suitable screening procedure to isolate B cells expressing DLL4-specific membrane bound antibody, e.g., by cell separation with DLL4 affinity chromatography or adsorption of cells to fluorochrome-labeled DLL4 followed by flow-activated cell sorting (FACS).

Alternatively, the use of spleen cells and/or B cells or other PBLs from an
20 unimmunized donor provides a better representation of the possible antibody repertoire, and also permits the construction of an antibody library using any animal (human or non-human) species in which DLL4 is not antigenic. For libraries incorporating *in vitro* antibody gene construction, stem cells are harvested from the subject to provide nucleic acids encoding unrearranged antibody gene segments. The immune cells of interest can be
25 obtained from a variety of animal species, such as human, mouse, rat, lagomorpha, luprine, canine, feline, porcine, bovine, equine, and avian species, etc.

Nucleic acid encoding antibody variable gene segments (including VH and VL segments) are recovered from the cells of interest and amplified. In the case of rearranged VH and VL gene libraries, the desired DNA can be obtained by isolating genomic DNA or
30 mRNA from lymphocytes followed by polymerase chain reaction (PCR) with primers matching the 5' and 3' ends of rearranged VH and VL genes as described in Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **86**: 3833-3837 (1989), thereby making diverse V gene repertoires for expression. The V genes can be amplified from cDNA and genomic DNA, with back primers at the 5' end of the exon encoding the mature V-domain and forward

primers based within the J-segment as described in Orlandi *et al.* (1989) and in Ward *et al.*, *Nature*, **341**: 544-546 (1989). However, for amplifying from cDNA, back primers can also be based in the leader exon as described in Jones *et al.*, *Biotechnol.*, **9**: 88-89 (1991), and forward primers within the constant region as described in Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **86**: 5728-5732 (1989). To maximize complementarity, degeneracy can be incorporated in the primers as described in Orlandi *et al.* (1989) or Sastry *et al.* (1989). Preferably, the library diversity is maximized by using PCR primers targeted to each V-gene family in order to amplify all available VH and VL arrangements present in the immune cell nucleic acid sample, e.g. as described in the method of Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**: 581-597 (1991) or as described in the method of Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **21**: 4491-4498 (1993). For cloning of the amplified DNA into expression vectors, rare restriction sites can be introduced within the PCR primer as a tag at one end as described in Orlandi *et al.* (1989), or by further PCR amplification with a tagged primer as described in Clackson *et al.*, *Nature*, **352**: 624-628 (1991).

Repertoires of synthetically rearranged V genes can be derived *in vitro* from V gene segments. Most of the human VH-gene segments have been cloned and sequenced (reported in Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **227**: 776-798 (1992)), and mapped (reported in Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, **3**: 88-94 (1993)); these cloned segments (including all the major conformations of the H1 and H2 loop) can be used to generate diverse VH gene repertoires with PCR primers encoding H3 loops of diverse sequence and length as described in Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**: 381-388 (1992). VH repertoires can also be made with all the sequence diversity focused in a long H3 loop of a single length as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 4457-4461 (1992). Human Vk and Vλ segments have been cloned and sequenced (reported in Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, **23**: 1456-1461 (1993)) and can be used to make synthetic light chain repertoires. Synthetic V gene repertoires, based on a range of VH and VL folds, and L3 and H3 lengths, will encode antibodies of considerable structural diversity. Following amplification of V-gene encoding DNAs, germline V-gene segments can be rearranged *in vitro* according to the methods of Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**: 381-388 (1992).

Repertoires of antibody fragments can be constructed by combining VH and VL gene repertoires together in several ways. Each repertoire can be created in different vectors, and the vectors recombined *in vitro*, e.g., as described in Hogrefe *et al.*, *Gene*, **128**: 119-126 (1993), or *in vivo* by combinatorial infection, e.g., the loxP system described

in Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **21**: 2265-2266 (1993). The *in vivo* recombination approach exploits the two-chain nature of Fab fragments to overcome the limit on library size imposed by *E. coli* transformation efficiency. Naive VH and VL repertoires are cloned separately, one into a phagemid and the other into a phage vector. The two libraries
5 are then combined by phage infection of phagemid-containing bacteria so that each cell contains a different combination and the library size is limited only by the number of cells present (about 10^{12} clones). Both vectors contain *in vivo* recombination signals so that the VH and VL genes are recombined onto a single replicon and are co-packaged into phage virions. These huge libraries provide large numbers of diverse antibodies of good affinity
10 (K_d^{-1} of about 10^8 M).

Alternatively, the repertoires may be cloned sequentially into the same vector, e.g. as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 7978-7982 (1991), or assembled together by PCR and then cloned, e.g. as described in Clackson *et al.*, *Nature*, **352**: 624-628 (1991). PCR assembly can also be used to join VH and VL DNAs with
15 DNA encoding a flexible peptide spacer to form single chain Fv (scFv) repertoires. In yet another technique, "in cell PCR assembly" is used to combine VH and VL genes within lymphocytes by PCR and then clone repertoires of linked genes as described in Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **20**: 3831-3837 (1992).

The antibodies produced by naive libraries (either natural or synthetic) can be of
20 moderate affinity (K_d^{-1} of about 10^6 to 10^7 M⁻¹), but affinity maturation can also be mimicked *in vitro* by constructing and reselecting from secondary libraries as described in Winter *et al.* (1994), *supra*. For example, mutation can be introduced at random *in vitro* by using error-prone polymerase (reported in Leung *et al.*, *Technique*, **1**: 11-15 (1989)) in the method of Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **226**: 889-896 (1992) or in the method of Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3576-3580 (1992). Additionally, affinity maturation
25 can be performed by randomly mutating one or more CDRs, e.g. using PCR with primers carrying random sequence spanning the CDR of interest, in selected individual Fv clones and screening for higher affinity clones. WO 9607754 (published 14 March 1996) described a method for inducing mutagenesis in a complementarity determining region of
30 an immunoglobulin light chain to create a library of light chain genes. Another effective approach is to recombine the VH or VL domains selected by phage display with repertoires of naturally occurring V domain variants obtained from unimmunized donors and screen for higher affinity in several rounds of chain reshuffling as described in Marks *et al.*,

Biotechnol., **10**: 779-783 (1992). This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the 10^{-9} M range.

DLL4 nucleic acid and amino acid sequences are known in the art. Nucleic acid sequence encoding the DLL4 can be designed using the amino acid sequence of the desired region of DLL4. Alternatively, the cDNA sequence (or fragments thereof) of GenBank Accession Nos. NM_019074. DLL4 is a transmembrane protein. The extracellular region contains 8 EGF-like repeats, as well as a DSL domain that is conserved among all Notch ligands and is necessary for receptor binding. The predicted protein also contains a transmembrane region, and a cytoplasmic tail lacking any catalytic motifs. Human DLL4 protein is a 685 amino acid protein and contains the following regions: signal peptide (amino acids 1-25); MNNL (amino acids 26-92); DSL (amino acids 155-217); EGF-Like (amino acids 221-251); EGF-Like (amino acids 252-282); EGF-Like (amino acids 284-322); EGF-Like (amino acids 324-360); EGF-Like (amino acids 366-400); EGF-Like (amino acids 402-438); EGF-Like (amino acids 440-476); EGF-Like (amino acids 480-518); transmembrane (amino acids 529-551); cytoplasmic domain (amino acids 552-685). The accession number of human DLL4 is NM_019074, and the accession number of mouse DLL4 is NM_019454.

DNAs encoding DLL4 can be prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, chemical synthesis by any of the methods described in Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**: 716-734 (1989), such as the triester, phosphite, phosphoramidite and H-phosphonate methods. In one embodiment, codons preferred by the expression host cell are used in the design of the DLL4 encoding DNA. Alternatively, DNA encoding the DLL4 can be isolated from a genomic or cDNA library.

Following construction of the DNA molecule encoding the DLL4, the DNA molecule is operably linked to an expression control sequence in an expression vector, such as a plasmid, wherein the control sequence is recognized by a host cell transformed with the vector. In general, plasmid vectors contain replication and control sequences which are derived from species compatible with the host cell. The vector ordinarily carries a replication site, as well as sequences which encode proteins that are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. Suitable vectors for expression in prokaryotic and eukaryotic host cells are known in the art and some are further described herein. Eukaryotic organisms, such as yeasts, or cells derived from multicellular organisms, such as mammals, may be used.

Optionally, the DNA encoding the DLL4 is operably linked to a secretory leader sequence resulting in secretion of the expression product by the host cell into the culture medium. Examples of secretory leader sequences include stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, alkaline phosphatase, invertase, and alpha factor. Also suitable for use herein is the 36 amino acid leader sequence of protein A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

Host cells are transfected and preferably transformed with the above-described expression or cloning vectors of this invention and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Transfection refers to the taking up of an expression vector by a host cell whether or not any coding sequences are in fact expressed. Numerous methods of transfection are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaPO₄ precipitation and electroporation. Successful transfection is generally recognized when any indication of the operation of this vector occurs within the host cell. Methods for transfection are well known in the art, and some are further described herein.

Transformation means introducing DNA into an organism so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. Methods for transformation are well known in the art, and some are further described herein.

Prokaryotic host cells used to produce the DLL4 can be cultured as described generally in Sambrook *et al.*, *supra*.

The mammalian host cells used to produce the DLL4 can be cultured in a variety of media, which is well known in the art and some of which is described herein.

The host cells referred to in this disclosure encompass cells in *in vitro* culture as well as cells that are within a host animal.

Purification of DLL4 may be accomplished using art-recognized methods, some of which are described herein.

The purified DLL4 can be attached to a suitable matrix such as agarose beads, acrylamide beads, glass beads, cellulose, various acrylic copolymers, hydroxyl methacrylate gels, polyacrylic and polymethacrylic copolymers, nylon, neutral and ionic carriers, and the like, for use in the affinity chromatographic separation of phage display clones. Attachment of the DLL4 protein to the matrix can be accomplished by the methods described in *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). A commonly employed technique

59

for attaching protein ligands to polysaccharide matrices, e.g. agarose, dextran or cellulose, involves activation of the carrier with cyanogen halides and subsequent coupling of the peptide ligand's primary aliphatic or aromatic amines to the activated matrix.

Alternatively, DLL4 can be used to coat the wells of adsorption plates, expressed
 5 on host cells affixed to adsorption plates or used in cell sorting, or conjugated to biotin for capture with streptavidin-coated beads, or used in any other art-known method for panning phage display libraries.

The phage library samples are contacted with immobilized DLL4 under conditions suitable for binding of at least a portion of the phage particles with the adsorbent.
 10 Normally, the conditions, including pH, ionic strength, temperature and the like are selected to mimic physiological conditions. The phages bound to the solid phase are washed and then eluted by acid, e.g. as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **88**: 7978-7982 (1991), or by alkali, e.g. as described in Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**: 581-597 (1991), or by DLL4 antigen competition, e.g. in a procedure similar to the
 15 antigen competition method of Clackson *et al.*, *Nature*, **352**: 624-628 (1991). Phages can be enriched 20-1,000-fold in a single round of selection. Moreover, the enriched phages can be grown in bacterial culture and subjected to further rounds of selection.

The efficiency of selection depends on many factors, including the kinetics of dissociation during washing, and whether multiple antibody fragments on a single phage
 20 can simultaneously engage with antigen. Antibodies with fast dissociation kinetics (and weak binding affinities) can be retained by use of short washes, multivalent phage display and high coating density of antigen in solid phase. The high density not only stabilizes the phage through multivalent interactions, but favors rebinding of phage that has dissociated. The selection of antibodies with slow dissociation kinetics (and good binding affinities)
 25 can be promoted by use of long washes and monovalent phage display as described in Bass *et al.*, *Proteins*, **8**: 309-314 (1990) and in WO 92/09690, and a low coating density of antigen as described in Marks *et al.*, *Biotechnol.*, **10**: 779-783 (1992).

It is possible to select between phage antibodies of different affinities, even with affinities that differ slightly, for DLL4. However, random mutation of a selected antibody
 30 (e.g. as performed in some of the affinity maturation techniques described above) is likely to give rise to many mutants, most binding to antigen, and a few with higher affinity. With limiting DLL4, rare high affinity phage could be competed out. To retain all the higher affinity mutants, phages can be incubated with excess biotinylated DLL4, but with the biotinylated DLL4 at a concentration of lower molarity than the target molar affinity

67

constant for DLL4. The high affinity-binding phages can then be captured by streptavidin-coated paramagnetic beads. Such "equilibrium capture" allows the antibodies to be selected according to their affinities of binding, with sensitivity that permits isolation of mutant clones with as little as two-fold higher affinity from a great excess of phages with lower affinity. Conditions used in washing phages bound to a solid phase can also be manipulated to discriminate on the basis of dissociation kinetics.

Anti-DLL4 clones may be activity selected. In one embodiment, the invention provides anti-DLL4 antibodies that block the binding between a Notch receptor (such as Notch1, Notch2, Notch3 and/or Notch4) and DLL4, but do not block the binding between a Notch receptor and a second protein. Fv clones corresponding to such anti-DLL4 antibodies can be selected by (1) isolating anti-DLL4 clones from a phage library as described above, and optionally amplifying the isolated population of phage clones by growing up the population in a suitable bacterial host; (2) selecting DLL4 and a second protein against which blocking and non-blocking activity, respectively, is desired; (3) adsorbing the anti-DLL4 phage clones to immobilized DLL4; (4) using an excess of the second protein to elute any undesired clones that recognize DLL4-binding determinants which overlap or are shared with the binding determinants of the second protein; and (5) eluting the clones which remain adsorbed following step (4). Optionally, clones with the desired blocking/non-blocking properties can be further enriched by repeating the selection procedures described herein one or more times.

DNA encoding the hybridoma-derived monoclonal antibodies or phage display Fv clones of the invention is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g. by using oligonucleotide primers designed to specifically amplify the heavy and light chain coding regions of interest from hybridoma or phage DNA template). Once isolated, the DNA can be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of the desired monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of antibody-encoding DNA include Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, **5**: 256 (1993) and Pluckthun, *Immunol. Revs.*, **130**: 151 (1992).

DNA encoding the Fv clones of the invention can be combined with known DNA sequences encoding heavy chain and/or light chain constant regions (e.g. the appropriate DNA sequences can be obtained from Kabat *et al.*, *supra*) to form clones encoding full or partial length heavy and/or light chains. It will be appreciated that constant regions of any

isotype can be used for this purpose, including IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE constant regions, and that such constant regions can be obtained from any human or animal species. A Fv clone derived from the variable domain DNA of one animal (such as human) species and then fused to constant region DNA of another animal species to form coding sequence(s) for "hybrid", full length heavy chain and/or light chain is included in the definition of "chimeric" and "hybrid" antibody as used herein. In a preferred embodiment, a Fv clone derived from human variable DNA is fused to human constant region DNA to form coding sequence(s) for all human, full or partial length heavy and/or light chains.

DNA encoding anti-DLL4 antibody derived from a hybridoma of the invention can also be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy- and light-chain constant domains in place of homologous murine sequences derived from the hybridoma clone (e.g. as in the method of Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6851-6855 (1984)). DNA encoding a hybridoma or Fv clone-derived antibody or fragment can be further modified by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In this manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of the Fv clone or hybridoma clone-derived antibodies of the invention.

Antibody Fragments

The present invention encompasses antibody fragments. In certain circumstances there are advantages of using antibody fragments, rather than whole antibodies. The smaller size of the fragments allows for rapid clearance, and may lead to improved access to solid tumors.

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **24**:107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science*, **229**:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. Fab, Fv and ScFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli*, thus allowing the facile production of large amounts of these fragments. Antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* **10**:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Fab and F(ab')₂ fragment with increased *in vivo* half-life comprising a salvage receptor binding epitope residues are described in U.S. Pat.

62

No. 5,869,046. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Pat. Nos. 5,571,894; and 5,587,458. Fv and sFv are the only species with intact combining sites that are devoid of constant regions; thus, they are suitable for reduced nonspecific binding during in vivo use. sFv fusion proteins may be constructed to yield fusion of an effector protein at either the amino or the carboxy terminus of an sFv. See Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*. The antibody fragment may also be a "linear antibody", e.g., as described in U.S. Pat. No. 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

10 **Humanized Antibodies**

The present invention encompasses humanized antibodies. Various methods for humanizing non-human antibodies are known in the art. For example, a humanized antibody can have one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

25 The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework for the humanized antibody (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

69

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to one method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Human antibodies

Human anti-DLL4 antibodies of the invention can be constructed by combining Fv clone variable domain sequence(s) selected from human-derived phage display libraries with known human constant domain sequences(s) as described above. Alternatively, human monoclonal anti-DLL4 antibodies of the invention can be made by the hybridoma method. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines for the production of human monoclonal antibodies have been described, for example, by Kozbor *J. Immunol.*, **133**: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, **147**: 86 (1991).

It is now possible to produce transgenic animals (e.g. mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (JH) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, e.g., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **90**: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, **362**: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, **7**: 33 (1993).

64

Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from non-human, e.g. rodent, antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting non-human antibody. According to this method, which is also called "epitope imprinting", either the heavy or light chain variable region of a non-human antibody
5 fragment obtained by phage display techniques as described above is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating a population of non-human chain/human chain scFv or Fab chimeras. Selection with antigen results in isolation of a non-human chain/human chain chimeric scFv or Fab wherein the human chain restores the antigen binding site destroyed upon removal of the corresponding non-human chain in the primary
10 phage display clone, i.e. the epitope governs (imprints) the choice of the human chain partner. When the process is repeated in order to replace the remaining non-human chain, a human antibody is obtained (see PCT WO 93/06213 published April 1, 1993). Unlike traditional humanization of non-human antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no FR or CDR residues of non-human
15 origin.

Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for DLL4 and the other is for any other antigen. Exemplary
20 bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the DLL4 protein. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express DLL4. These antibodies possess an DLL4-binding arm and an arm which binds the cytotoxic agent (e.g. saporin, anti-interferon- α , vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies
25 or antibody fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies).

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, *Nature*, **305**: 537 (1983)). Because of the random
30 assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low.

65

Similar procedures are disclosed in WO 93/08829 published May 13, 1993, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

According to a different and more preferred approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1), containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This

provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (US Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360, WO 92/00373, and EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in US Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science*, **229**: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab' -TNB derivatives is then reconverted to the Fab' -thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab' -TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab' -SH fragments from *E. coli*, which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, **175**: 217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the HER2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, **148**(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody

67

homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the VH and VL domains of one fragment are forced to pair with the complementary VL and VH domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, **152**:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.* *J. Immunol.* **147**: 60 (1991).

Multivalent Antibodies

A multivalent antibody may be internalized (and/or catabolized) faster than a bivalent antibody by a cell expressing an antigen to which the antibodies bind. The antibodies of the present invention can be multivalent antibodies (which are other than of the IgM class) with three or more antigen binding sites (e.g. tetravalent antibodies), which can be readily produced by recombinant expression of nucleic acid encoding the polypeptide chains of the antibody. The multivalent antibody can comprise a dimerization domain and three or more antigen binding sites. The preferred dimerization domain comprises (or consists of) an Fc region or a hinge region. In this scenario, the antibody will comprise an Fc region and three or more antigen binding sites amino-terminal to the Fc region. The preferred multivalent antibody herein comprises (or consists of) three to about eight, but preferably four, antigen binding sites. The multivalent antibody comprises at least one polypeptide chain (and preferably two polypeptide chains), wherein the polypeptide chain(s) comprise two or more variable domains. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, wherein VD1 is a first variable domain, VD2 is a second variable domain, Fc is one polypeptide chain of an Fc region, X1 and X2 represent an amino acid or polypeptide, and n is 0 or 1. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise: VH-CH1-flexible linker-VH-CH1-Fc region chain; or VH-CH1-VH-CH1-Fc region chain. The multivalent antibody herein preferably further comprises at least two (and preferably four) light chain variable domain polypeptides. The multivalent antibody herein may, for instance, comprise from about two to about eight

68

light chain variable domain polypeptides. The light chain variable domain polypeptides contemplated here comprise a light chain variable domain and, optionally, further comprise a CL domain.

Antibody Variants

5 In some embodiments, amino acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for
10 example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid alterations may be introduced in the subject antibody amino acid sequence at the time that sequence is made.

15 A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or
20 polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a
25 mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed immunoglobulins are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of
30 terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (*e.g.* for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Glycosylation of polypeptides is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylglucosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

10 Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

15 Where the antibody comprises an Fc region, the carbohydrate attached thereto may be altered. For example, antibodies with a mature carbohydrate structure that lacks fucose attached to an Fc region of the antibody are described in US Pat Appl No US 2003/0157108 (Presta, L.). See also US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Antibodies with a bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the carbohydrate attached to an Fc region of the antibody are referenced in WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* and US 20 Patent No. 6,602,684, Umana *et al.* Antibodies with at least one galactose residue in the oligosaccharide attached to an Fc region of the antibody are reported in WO 1997/30087, Patel *et al.* See, also, WO 1998/58964 (Raju, S.) and WO 1999/22764 (Raju, S.) concerning antibodies with altered carbohydrate attached to the Fc region thereof. See also 25 US 2005/0123546 (Umana *et al.*) on antigen-binding molecules with modified glycosylation.

The preferred glycosylation variant herein comprises an Fc region, wherein a carbohydrate structure attached to the Fc region lacks fucose. Such variants have improved ADCC function. Optionally, the Fc region further comprises one or more amino acid substitutions therein which further improve ADCC, for example, substitutions at 30 positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region (Eu numbering of residues). Examples of publications related to "defucosylated" or "fucose-deficient" antibodies include: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US

70

2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO
2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004);
Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Examples of cell lines producing
defucosylated antibodies include Lec13 CHO cells deficient in protein fucosylation (Ripka
5 *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US Pat Appl No US 2003/0157108
A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especially at Example 11), and
knockout cell lines, such as alpha-1,6-fucosyltransferase gene, *FUT8*, knockout CHO cells
(Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have
10 at least one amino acid residue in the antibody molecule replaced by a different residue.
The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable
regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in
Table 1 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a
change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary
15 substitutions" in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes,
may be introduced and the products screened.

Table 1

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- 10
- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- (3) acidic: asp, glu;
(4) basic: his, lys, arg;
(5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
(6) aromatic: trp, tyr, phe.

5 Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

One type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.* a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological
10 properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.* 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibodies thus generated are displayed from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13
15 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.* binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure
20 of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

25 Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or
30 a non-variant version of the antibody.

It may be desirable to introduce one or more amino acid modifications in an Fc region of the immunoglobulin polypeptides of the invention, thereby generating a Fc

region variant. The Fc region variant may comprise a human Fc region sequence (e.g., a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (e.g. a substitution) at one or more amino acid positions including that of a hinge cysteine. In accordance with this description and the teachings of the art, it is contemplated that in some embodiments, an antibody used in methods of the invention may comprise one or more alterations as compared to the wild type counterpart antibody, e.g. in the Fc region. These antibodies would nonetheless retain substantially the same characteristics required for therapeutic utility as compared to their wild type counterpart. For example, it is thought that certain alterations can be made in the Fc region that would result in altered (i.e., either improved or diminished) C1q binding and/or Complement Dependent Cytotoxicity (CDC), e.g., as described in WO99/51642. See also Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); US Patent No. 5,648,260; US Patent No. 5,624,821; and WO94/29351 concerning other examples of Fc region variants. WO00/42072 (Presta) and WO 2004/056312 (Lowman) describe antibody variants with improved or diminished binding to FcRs. The content of these patent publications are specifically incorporated herein by reference. See, also, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Antibodies with increased half lives and improved binding to the neonatal Fc receptor (FcRn), which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), are described in US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). These antibodies comprise an Fc region with one or more substitutions therein which improve binding of the Fc region to FcRn. Polypeptide variants with altered Fc region amino acid sequences and increased or decreased C1q binding capability are described in US patent No. 6,194,551B1, WO99/51642. The contents of those patent publications are specifically incorporated herein by reference. See, also, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Antibody Derivatives

The antibodies of the present invention can be further modified to contain additional nonproteinaceous moieties that are known in the art and readily available. Preferably, the moieties suitable for derivatization of the antibody are water soluble polymers. Non-limiting examples of water soluble polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1,3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl

pyrrolidone)polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), polyvinyl alcohol, and mixtures thereof. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. The number of polymers attached to the antibody may vary, and if more than one polymers are attached, they can be the same or different molecules. In general, the number and/or type of polymers used for derivatization can be determined based on considerations including, but not limited to, the particular properties or functions of the antibody to be improved, whether the antibody derivative will be used in a therapy under defined conditions, etc.

Screening for antibodies with desired properties

The antibodies of the present invention can be characterized for their physical/chemical properties and biological functions by various assays known in the art. In some embodiments, antibodies are characterized for any one or more of binding to DLL4; and/or reduction or blocking of Notch receptor activation; and/or reduction or blocking of Notch receptor downstream molecular signaling; and/or disruption or blocking of Notch receptor binding to DLL4; and/or promotion of endothelial cell proliferation; and/or inhibition of endothelial cell differentiation; and/or inhibition of arterial differentiation; and/or inhibition of tumor vascular perfusion; and/or treatment and/or prevention of a tumor, cell proliferative disorder or a cancer; and/or treatment or prevention of a disorder associated with DLL4 expression and/or activity; and/or treatment or prevention of a disorder associated with Notch receptor expression and/or activity.

The purified antibodies can be further characterized by a series of assays including, but not limited to, N-terminal sequencing, amino acid analysis, non-denaturing size exclusion high pressure liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry, ion exchange chromatography and papain digestion.

In certain embodiments of the invention, the antibodies produced herein are analyzed for their biological activity. In some embodiments, the antibodies of the present invention are tested for their antigen binding activity. The antigen binding assays that are known in the art and can be used herein include without limitation any direct or competitive binding assays using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, fluorescent immunoassays, and protein A immunoassays. Illustrative antigen binding assay are provided below in the Examples section.

HS

In still another embodiment, the invention provides anti-DLL4 monoclonal antibodies that compete with a 26.6, 26.14, 26.20, 26.34, and/or 26.82 antibody for binding to DLL4. Such competitor antibodies include antibodies that recognize an DLL4 epitope that is the same as or overlaps with the DLL4 epitope recognized by antibody 26.6, 26.14, 26.20, 26.34, and/or 26.82. Such competitor antibodies can be obtained by screening anti-DLL4 hybridoma supernatants for binding to immobilized DLL4 in competition with labeled 26.6, 26.14, 26.20, 26.34, and/or 26.82 antibody. A hybridoma supernatant containing competitor antibody will reduce the amount of bound, labeled antibody detected in the subject competition binding mixture as compared to the amount of bound, labeled antibody detected in a control binding mixture containing irrelevant (or no) antibody. Any of the competition binding assays described herein are suitable for use in the foregoing procedure.

In another aspect, the invention provides an anti-DLL4 monoclonal antibody that comprises one or more (such as 2, 3, 4, 5, and/or 6) HVRs of an 26.6, 26.14, 26.20, 26.34, and/or 26.82 antibody. An anti-DLL4 monoclonal antibody that comprises one or more HVR(s) of an 26.6, 26.14, 26.20, 26.34, and/or 26.82 antibody can be constructed by grafting one or more HVR(s) of an 26.6, 26.14, 26.20, 26.34, and/or 26.82 antibody onto a template antibody sequence, e.g. a human antibody sequence which is closest to the corresponding murine sequence of the parental antibody, or a consensus sequence of all human antibodies in the particular subgroup of the parental antibody light or heavy chain, and expressing the resulting chimeric light and/or heavy chain variable region sequence(s), with or without accompanying constant region sequence(s), in recombinant host cells as described herein.

Anti-DLL4 antibodies of the invention possessing the unique properties described herein can be obtained by screening anti-DLL4 hybridoma clones for the desired properties by any convenient method. For example, if an anti-DLL4 monoclonal antibody that blocks or does not block the binding of Notch receptors to DLL4 is desired, the candidate antibody can be tested in a binding competition assay, such as a competitive binding ELISA, wherein plate wells are coated with DLL4, and a solution of antibody in an excess of the Notch receptor of interest is layered onto the coated plates, and bound antibody is detected enzymatically, e.g. contacting the bound antibody with HRP-conjugated anti-Ig antibody or biotinylated anti-Ig antibody and developing the HRP color reaction., e.g. by developing plates with streptavidin-HRP and/or hydrogen peroxide and detecting the HRP color reaction by spectrophotometry at 490 nm with an ELISA plate reader.

26

In one embodiment, the present invention contemplates an altered antibody that possesses some but not all effector functions, which make it a desired candidate for many applications in which the half life of the antibody *in vivo* is important yet certain effector functions (such as complement and ADCC) are unnecessary or deleterious. In certain

5 embodiments, the Fc activities of the produced immunoglobulin are measured to ensure that only the desired properties are maintained. *In vitro* and/or *in vivo* cytotoxicity assays can be conducted to confirm the reduction/depletion of CDC and/or ADCC activities. For example, Fc receptor (FcR) binding assays can be conducted to ensure that the antibody lacks FcγR binding (hence likely lacking ADCC activity), but retains FcRn binding ability.

10 The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). An example of an *in vitro* assay to assess ADCC activity of a molecule of interest is described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337. Useful effector cells for such assays

15 include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.A* 95:652-656 (1998). C1q binding assays may also be carried out to confirm that the antibody is unable to bind C1q and hence lacks CDC activity. To assess complement

20 activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed. FcRn binding and *in vivo* clearance/half life determinations can also be performed using methods known in the art, e.g. those described in the Examples section.

Vectors, Host Cells and Recombinant Methods

25 For recombinant production of an antibody of the invention, the nucleic acid encoding it is isolated and inserted into a replicable vector for further cloning (amplification of the DNA) or for expression. DNA encoding the antibody is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains

30 of the antibody). Many vectors are available. The choice of vector depends in part on the host cell to be used. Generally, preferred host cells are of either prokaryotic or eukaryotic (generally mammalian) origin. It will be appreciated that constant regions of any isotype

77

can be used for this purpose, including IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE constant regions, and that such constant regions can be obtained from any human or animal species.

a. Generating antibodies using prokaryotic host cells:

i. *Vector Construction*

5 Polynucleotide sequences encoding polypeptide components of the antibody of the invention can be obtained using standard recombinant techniques. Desired polynucleotide sequences may be isolated and sequenced from antibody producing cells such as hybridoma cells. Alternatively, polynucleotides can be synthesized using nucleotide synthesizer or PCR techniques. Once obtained, sequences encoding the polypeptides are
10 inserted into a recombinant vector capable of replicating and expressing heterologous polynucleotides in prokaryotic hosts. Many vectors that are available and known in the art can be used for the purpose of the present invention. Selection of an appropriate vector will depend mainly on the size of the nucleic acids to be inserted into the vector and the particular host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various
15 components, depending on its function (amplification or expression of heterologous polynucleotide, or both) and its compatibility with the particular host cell in which it resides. The vector components generally include, but are not limited to: an origin of replication, a selection marker gene, a promoter, a ribosome binding site (RBS), a signal sequence, the heterologous nucleic acid insert and a transcription termination sequence.

20 In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with these hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* is typically transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species. pBR322
25 contains genes encoding ampicillin (Amp) and tetracycline (Tet) resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. pBR322, its derivatives, or other microbial plasmids or bacteriophage may also contain, or be modified to contain, promoters which can be used by the microbial organism for expression of endogenous proteins. Examples of pBR322 derivatives used for expression of particular antibodies are
30 described in detail in Carter et al., U.S. Patent No. 5,648,237.

In addition, phage vectors containing replicon and control sequences that are compatible with the host microorganism can be used as transforming vectors in connection with these hosts. For example, bacteriophage such as λ GEMTM-11 may be utilized in

making a recombinant vector which can be used to transform susceptible host cells such as *E. coli* LE392.

The expression vector of the invention may comprise two or more promoter-cistron pairs, encoding each of the polypeptide components. A promoter is an untranslated regulatory sequence located upstream (5') to a cistron that modulates its expression. Prokaryotic promoters typically fall into two classes, inducible and constitutive. Inducible promoter is a promoter that initiates increased levels of transcription of the cistron under its control in response to changes in the culture condition, e.g. the presence or absence of a nutrient or a change in temperature.

A large number of promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. The selected promoter can be operably linked to cistron DNA encoding the light or heavy chain by removing the promoter from the source DNA via restriction enzyme digestion and inserting the isolated promoter sequence into the vector of the invention. Both the native promoter sequence and many heterologous promoters may be used to direct amplification and/or expression of the target genes. In some embodiments, heterologous promoters are utilized, as they generally permit greater transcription and higher yields of expressed target gene as compared to the native target polypeptide promoter.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the *PhoA* promoter, the β -galactamase and lactose promoter systems, a tryptophan (*trp*) promoter system and hybrid promoters such as the *tac* or the *trc* promoter. However, other promoters that are functional in bacteria (such as other known bacterial or phage promoters) are suitable as well. Their nucleotide sequences have been published, thereby enabling a skilled worker operably to ligate them to cistrons encoding the target light and heavy chains (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) using linkers or adaptors to supply any required restriction sites.

In one aspect of the invention, each cistron within the recombinant vector comprises a secretion signal sequence component that directs translocation of the expressed polypeptides across a membrane. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the target polypeptide DNA that is inserted into the vector. The signal sequence selected for the purpose of this invention should be one that is recognized and processed (i.e. cleaved by a signal peptidase) by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the signal sequences native to the heterologous polypeptides, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group consisting of the alkaline phosphatase,

penicillinase, Ipp, or heat-stable enterotoxin II (STII) leaders, LamB, PhoE, PelB, OmpA and MBP. In one embodiment of the invention, the signal sequences used in both cistrons of the expression system are STII signal sequences or variants thereof.

In another aspect, the production of the immunoglobulins according to the invention can occur in the cytoplasm of the host cell, and therefore does not require the presence of secretion signal sequences within each cistron. In that regard, immunoglobulin light and heavy chains are expressed, folded and assembled to form functional immunoglobulins within the cytoplasm. Certain host strains (e.g., the *E. coli* trxB- strains) provide cytoplasm conditions that are favorable for disulfide bond formation, thereby permitting proper folding and assembly of expressed protein subunits. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Prokaryotic host cells suitable for expressing antibodies of the invention include Archaeobacteria and Eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms. Examples of useful bacteria include Escherichia (e.g., *E. coli*), Bacilli (e.g., *B. subtilis*), Enterobacteria, Pseudomonas species (e.g., *P. aeruginosa*), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, or Paracoccus. In one embodiment, gram-negative cells are used. In one embodiment, *E. coli* cells are used as hosts for the invention. Examples of *E. coli* strains include strain W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC® Deposit No. 27,325) and derivatives thereof, including strain 33D3 having genotype W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (U.S. Pat. No. 5,639,635). Other strains and derivatives thereof, such as *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537) and *E. coli* RV308(ATCC 31,608) are also suitable. These examples are illustrative rather than limiting. Methods for constructing derivatives of any of the above-mentioned bacteria having defined genotypes are known in the art and described in, for example, Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). It is generally necessary to select the appropriate bacteria taking into consideration replicability of the replicon in the cells of a bacterium. For example, *E. coli*, Serratia, or Salmonella species can be suitably used as the host when well known plasmids such as pBR322, pBR325, pACYC177, or pKN410 are used to supply the replicon. Typically the host cell should secrete minimal amounts of proteolytic enzymes, and additional protease inhibitors may desirably be incorporated in the cell culture.

ii. Antibody Production

2

Host cells are transformed with the above-described expression vectors and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Transformation means introducing DNA into the prokaryotic host so that the DNA
5 is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride is generally used for bacterial cells that contain substantial cell-wall barriers. Another method for transformation employs polyethylene glycol/DMSO. Yet another technique used is
10 electroporation.

Prokaryotic cells used to produce the polypeptides of the invention are grown in media known in the art and suitable for culture of the selected host cells. Examples of suitable media include luria broth (LB) plus necessary nutrient supplements. In some
15 embodiments, the media also contains a selection agent, chosen based on the construction of the expression vector, to selectively permit growth of prokaryotic cells containing the expression vector. For example, ampicillin is added to media for growth of cells expressing ampicillin resistant gene.

Any necessary supplements besides carbon, nitrogen, and inorganic phosphate sources may also be included at appropriate concentrations introduced alone or as a
20 mixture with another supplement or medium such as a complex nitrogen source. Optionally the culture medium may contain one or more reducing agents selected from the group consisting of glutathione, cysteine, cystamine, thioglycollate, dithioerythritol and dithiothreitol.

The prokaryotic host cells are cultured at suitable temperatures. For *E. coli* growth,
25 for example, the preferred temperature ranges from about 20°C to about 39°C, more preferably from about 25°C to about 37°C, even more preferably at about 30°C. The pH of the medium may be any pH ranging from about 5 to about 9, depending mainly on the host organism. For *E. coli*, the pH is preferably from about 6.8 to about 7.4, and more preferably about 7.0.

30 If an inducible promoter is used in the expression vector of the invention, protein expression is induced under conditions suitable for the activation of the promoter. In one aspect of the invention, PhoA promoters are used for controlling transcription of the polypeptides. Accordingly, the transformed host cells are cultured in a phosphate-limiting

87

medium for induction. Preferably, the phosphate-limiting medium is the C.R.A.P medium (see, e.g., Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). A variety of other inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art.

In one embodiment, the expressed polypeptides of the present invention are
5 secreted into and recovered from the periplasm of the host cells. Protein recovery typically involves disrupting the microorganism, generally by such means as osmotic shock, sonication or lysis. Once cells are disrupted, cell debris or whole cells may be removed by centrifugation or filtration. The proteins may be further purified, for example, by affinity resin chromatography. Alternatively, proteins can be transported into the culture media
10 and isolated therein. Cells may be removed from the culture and the culture supernatant being filtered and concentrated for further purification of the proteins produced. The expressed polypeptides can be further isolated and identified using commonly known methods such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot assay.

In one aspect of the invention, antibody production is conducted in large quantity
15 by a fermentation process. Various large-scale fed-batch fermentation procedures are available for production of recombinant proteins. Large-scale fermentations have at least 1000 liters of capacity, preferably about 1,000 to 100,000 liters of capacity. These fermentors use agitator impellers to distribute oxygen and nutrients, especially glucose (the preferred carbon/energy source). Small scale fermentation refers generally to fermentation
20 in a fermentor that is no more than approximately 100 liters in volumetric capacity, and can range from about 1 liter to about 100 liters.

In a fermentation process, induction of protein expression is typically initiated after the cells have been grown under suitable conditions to a desired density, e.g., an OD₅₅₀ of about 180-220, at which stage the cells are in the early stationary phase. A variety of
25 inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art and described above. Cells may be grown for shorter periods prior to induction. Cells are usually induced for about 12-50 hours, although longer or shorter induction time may be used.

To improve the production yield and quality of the polypeptides of the invention,
30 various fermentation conditions can be modified. For example, to improve the proper assembly and folding of the secreted antibody polypeptides, additional vectors overexpressing chaperone proteins, such as Dsb proteins (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD and or DsbG) or FkpA (a peptidylprolyl cis,trans-isomerase with chaperone activity) can be used to co-transform the host prokaryotic cells. The chaperone proteins have been

82

demonstrated to facilitate the proper folding and solubility of heterologous proteins produced in bacterial host cells. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., U.S. Patent No. 6,083,715; Georgiou et al., U.S. Patent No. 6,027,888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun
5 (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

To minimize proteolysis of expressed heterologous proteins (especially those that are proteolytically sensitive), certain host strains deficient for proteolytic enzymes can be used for the present invention. For example, host cell strains may be modified to effect genetic mutation(s) in the genes encoding known bacterial proteases such as Protease III,
10 OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI and combinations thereof. Some *E. coli* protease-deficient strains are available and described in, for example, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,264,365; Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

In one embodiment, *E. coli* strains deficient for proteolytic enzymes and
15 transformed with plasmids overexpressing one or more chaperone proteins are used as host cells in the expression system of the invention.

iii. Antibody Purification

Standard protein purification methods known in the art can be employed. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: fractionation on
20 immunoaffinity or ion-exchange columns, ethanol precipitation, reverse phase HPLC, chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE, chromatofocusing, SDS-PAGE, ammonium sulfate precipitation, and gel filtration using, for example, Sephadex G-75.

In one aspect, Protein A immobilized on a solid phase is used for immunoaffinity
25 purification of the full length antibody products of the invention. Protein A is a 41kD cell wall protein from *Staphylococcus aureas* which binds with a high affinity to the Fc region of antibodies. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. The solid phase to which Protein A is immobilized is preferably a column comprising a glass or silica surface, more preferably a controlled pore glass column or a silicic acid column. In some applications,
30 the column has been coated with a reagent, such as glycerol, in an attempt to prevent nonspecific adherence of contaminants.

As the first step of purification, the preparation derived from the cell culture as described above is applied onto the Protein A immobilized solid phase to allow specific binding of the antibody of interest to Protein A. The solid phase is then washed to remove

contaminants non-specifically bound to the solid phase. Finally the antibody of interest is recovered from the solid phase by elution.

b. Generating antibodies using eukaryotic host cells:

The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence.

(i) *Signal sequence component*

A vector for use in a eukaryotic host cell may also contain a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide of interest. The heterologous signal sequence selected preferably is one that is recognized and processed (i.e., cleaved by a signal peptidase) by the host cell. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences as well as viral secretory leaders, for example, the herpes simplex gD signal, are available.

The DNA for such precursor region is ligated in reading frame to DNA encoding the antibody.

(ii) *Origin of replication*

Generally, an origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors. For example, the SV40 origin may typically be used only because it contains the early promoter.

(iii) *Selection gene component*

Expression and cloning vectors may contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, where relevant, or (c) supply critical nutrients not available from complex media.

One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. Those cells that are successfully transformed with a heterologous gene produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs neomycin, mycophenolic acid and hygromycin.

Another example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the antibody nucleic acid, such as DHFR, thymidine kinase, metallothionein-I and -II, preferably primate metallothionein genes, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, etc.

For example, cells transformed with the DHFR selection gene are first identified by culturing all of the transformants in a culture medium that contains methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity (e.g.,
5 ATCC CRL-9096).

Alternatively, host cells (particularly wild-type hosts that contain endogenous DHFR) transformed or co-transformed with DNA sequences encoding an antibody, wild-type DHFR protein, and another selectable marker such as aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) can be selected by cell growth in medium containing a selection
10 agent for the selectable marker such as an aminoglycosidic antibiotic, e.g., kanamycin, neomycin, or G418. See U.S. Patent No. 4,965,199.

(iv) Promoter component

Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the antibody polypeptide nucleic acid. Promoter
15 sequences are known for eukaryotes. Virtually alleukaryotic genes have an AT-rich region located approximately 25 to 30 bases upstream from the site where transcription is initiated. Another sequence found 70 to 80 bases upstream from the start of transcription of many genes is a CNCAAT region where N may be any nucleotide (SEQ ID NO: 60). At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the signal for
20 addition of the poly A tail to the 3' end of the coding sequence (SEQ ID NO: 61). All of these sequences are suitably inserted into eukaryotic expression vectors.

Antibody polypeptide transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus,
25 avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40); from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an
30 SV40 restriction fragment that also contains the SV40 viral origin of replication. The immediate early promoter of the human cytomegalovirus is conveniently obtained as a HindIII E restriction fragment. A system for expressing DNA in mammalian hosts using the bovine papilloma virus as a vector is disclosed in U.S. Patent No. 4,419,446. A

modification of this system is described in U.S. Patent No. 4,601,978. Alternatively, the Rous Sarcoma Virus long terminal repeat can be used as the promoter.

(v) *Enhancer element component*

Transcription of DNA encoding the antibody polypeptide of this invention by
5 higher eukaryotes is often increased by inserting an enhancer sequence into the vector.
Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase,
albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a
eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the
replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma
10 enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. See also
Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) on enhancing elements for activation of eukaryotic
promoters. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the
antibody polypeptide-encoding sequence, but is preferably located at a site 5' from the
promoter.

15 (vi) *Transcription termination component*

Expression vectors used in eukaryotic host cells will typically also contain
sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA.
Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated
regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide
20 segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA
encoding an antibody. One useful transcription termination component is the bovine
growth hormone polyadenylation region. See WO94/11026 and the expression vector
disclosed therein.

(vii) *Selection and transformation of host cells*

25 Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include
higher eukaryote cells described herein, including vertebrate host cells. Propagation of
vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of
useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40
(COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for
30 growth in suspension culture, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); baby hamster
kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub et
al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol.*
Reprod. 23:243-251 (1980); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green
monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells

2

(HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and
5 a human hepatoma line (Hep G2).

Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for antibody production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

10 (viii) *Culturing the host cells*

The host cells used to produce an antibody of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition,
15 any of the media described in Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; or U.S. Patent Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth
20 factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCINTM drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate
25 concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

(ix) *Purification of antibody*

When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly,
30 or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Where the antibody is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a

87

commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon® ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants.

5 The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, with affinity chromatography being the preferred purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify
10 antibodies that are based on human $\gamma 1$, $\gamma 2$, or $\gamma 4$ heavy chains (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human $\gamma 3$ (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene allow for
15 faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a CH3 domain, the Bakerbond ABX™ resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography
20 on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction
25 chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (e.g., from about 0-0.25 M salt).

Immunoconjugates

The invention also provides immunoconjugates (interchangeably termed "antibody-drug conjugates" or "ADC"), comprising any of the anti-DLL4 antibodies described herein
30 conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, a drug, a growth inhibitory agent, a toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

The use of antibody-drug conjugates for the local delivery of cytotoxic or cytostatic agents, i.e. drugs to kill or inhibit tumor cells in the treatment of cancer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; U.S. patent 4,975,278) allows targeted delivery of the drug moiety to tumors, and intracellular accumulation therein, where systemic administration of these unconjugated drug agents may result in unacceptable levels of toxicity to normal cells as well as the tumor cells sought to be eliminated (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Maximal efficacy with minimal toxicity is sought thereby. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been reported as useful in these strategies (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Drugs used in these methods include daunomycin, doxorubicin, methotrexate, and vindesine (Rowland et al., (1986) *supra*). Toxins used in antibody-toxin conjugates include bacterial toxins such as diphtheria toxin, plant toxins such as ricin, small molecule toxins such as geldanamycin (Mandler et al (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), and calicheamicin (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). The toxins may effect their cytotoxic and cytostatic effects by mechanisms including tubulin binding, DNA binding, or topoisomerase inhibition. Some cytotoxic drugs tend to be inactive or less active when conjugated to large antibodies or protein receptor ligands.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) is an antibody-radioisotope conjugate composed of a murine IgG1 kappa monoclonal antibody directed against the CD20 antigen found on the surface of normal and malignant B lymphocytes and ¹¹¹In or ⁹⁰Y radioisotope bound by a thiourea linker-chelator (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Although ZEVALIN has activity against B-cell non-Hodgkin's Lymphoma (NHL), administration results in severe and prolonged cytopenias in most patients. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), an antibody drug conjugate composed of a hu CD33 antibody linked to calicheamicin, was approved in 2000

for the treatment of acute myeloid leukemia by injection (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; US Patent Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), an antibody drug conjugate composed of the huC242 antibody linked via the disulfide linker SPP to the maytansinoid drug moiety, DM1, is advancing into Phase II trials for the treatment of cancers that express CanAg, such as colon, pancreatic, gastric, and others. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), an antibody drug conjugate composed of the anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody linked to the maytansinoid drug moiety, DM1, is under development for the potential treatment of prostate tumors. The auristatin peptides, auristatin E (AE) and monomethylauristatin (MMAE), synthetic analogs of dolastatin, were conjugated to chimeric monoclonal antibodies cBR96 (specific to Lewis Y on carcinomas) and cAC10 (specific to CD30 on hematological malignancies) (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) and are under therapeutic development.

Chemotherapeutic agents useful in the generation of immunoconjugates are described herein (eg., above). Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. See, e.g., WO 93/21232 published October 28, 1993. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , and ^{186}Re . Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), 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). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene

aw

triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, dolastatins, aurostatins, a trichothecene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, are also contemplated herein.

i. Maytansine and maytansinoids

In some embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody (full length or fragments) of the invention conjugated to one or more maytansinoid molecules.

Maytansinoids are mitototic inhibitors which act by inhibiting tubulin polymerization. Maytansine was first isolated from the east African shrub *Maytenus serrata* (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and derivatives and analogues thereof are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; and 4,371,533.

Maytansinoid drug moieties are attractive drug moieties in antibody drug conjugates because they are: (i) relatively accessible to prepare by fermentation or chemical modification, derivatization of fermentation products, (ii) amenable to derivatization with functional groups suitable for conjugation through the non-disulfide linkers to antibodies, (iii) stable in plasma, and (iv) effective against a variety of tumor cell lines.

Immunoconjugates containing maytansinoids, methods of making same, and their therapeutic use are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an in vivo tumor growth assay. Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA.1 that binds the HER-2/neu oncogene. The

91

cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested in vitro on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3×10^5 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug, which could be increased by increasing the number of maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

Antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. See, e.g., U.S. Patent No. 5,208,020 (the disclosure of which is hereby expressly incorporated by reference). An average of 3-4 maytansinoid molecules conjugated per antibody molecule has shown efficacy in enhancing cytotoxicity of target cells without negatively affecting the function or solubility of the antibody, although even one molecule of toxin/antibody would be expected to enhance cytotoxicity over the use of naked antibody. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992), and U.S. Patent Application No. 10/960,602, filed Oct. 8, 2004, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Antibody-maytansinoid conjugates comprising the linker component SMCC may be prepared as disclosed in U.S. Patent Application No. 10/960,602, filed Oct. 8, 2004. The linking groups include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups, or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred. Additional linking groups are described and exemplified herein.

Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde),

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). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson et al.; *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) and N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to provide for a disulfide linkage.

The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on the type of the link. For example, an ester linkage may be formed by reaction with a hydroxyl group using conventional coupling techniques. The reaction may occur at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

ii. Auristatins and dolastatins

In some embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody of the invention conjugated to dolastatins or dolostatin peptidic analogs and derivatives, the auristatins (US Patent Nos. 5635483; 5780588). Dolastatins and auristatins have been shown to interfere with microtubule dynamics, GTP hydrolysis, and nuclear and cellular division (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) and have anticancer (US 5663149) and antifungal activity (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). The dolastatin or auristatin drug moiety may be attached to the antibody through the N (amino) terminus or the C (carboxyl) terminus of the peptidic drug moiety (WO 02/088172).

Exemplary auristatin embodiments include the N-terminus linked monomethylauristatin drug moieties DE and DF, disclosed in "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004, the disclosure of which is expressly incorporated by reference in its entirety.

Typically, peptide-based drug moieties can be prepared by forming a peptide bond between two or more amino acids and/or peptide fragments. Such peptide bonds can be prepared, for example, according to the liquid phase synthesis method (see E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) that is well known in the field of peptide chemistry. The auristatin/dolastatin drug moieties may be prepared according to the methods of: US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R.,

93

et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; and Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. See also Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004, hereby incorporated by reference in its entirety (disclosing, e.g., linkers and methods of preparing monomethylvaline compounds such as MMAE and MMAF conjugated to linkers).

iii. Calicheamicin

In other embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody of the invention conjugated to one or more calicheamicin molecules. The calicheamicin family of antibiotics are capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. For the preparation of conjugates of the calicheamicin family, see U.S. patents 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (all to American Cyanamid Company). Structural analogues of calicheamicin which may be used include, but are not limited to, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetyl- γ_1^1 , PSAG and θ^1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) and the aforementioned U.S. patents to American Cyanamid). Another anti-tumor drug that the antibody can be conjugated is QFA which is an antifolate. Both calicheamicin and QFA have intracellular sites of action and do not readily cross the plasma membrane. Therefore, cellular uptake of these agents through antibody mediated internalization greatly enhances their cytotoxic effects.

iv. Other cytotoxic agents

Other antitumor agents that can be conjugated to the antibodies of the invention include BCNU, streptozocin, vincristine and 5-fluorouracil, the family of agents known collectively LL-E33288 complex described in U.S. patents 5,053,394, 5,770,710, as well as esperamicins (U.S. patent 5,877,296).

Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, croton, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tricothecenes. See, for example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

94

The present invention further contemplates an immunoconjugate formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (e.g., a ribonuclease or a DNA endonuclease such as a deoxyribonuclease; DNase).

For selective destruction of the tumor, the antibody may comprise a highly radioactive atom. A variety of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the conjugate is used for detection, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic studies, for example $\text{tc}^{99\text{m}}$ or I^{123} , or a spin label for nuclear magnetic resonance (NMR) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways. For example, the peptide may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such as $\text{tc}^{99\text{m}}$ or I^{123} , Re^{186} , Re^{188} and In^{111} can be attached via a cysteine residue in the peptide. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. The IODOGEN method (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) can be used to incorporate iodine-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describes other methods in detail.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), 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). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, photolabile linker, dimethyl linker or

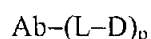
disulfide-containing linker (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) may be used.

The compounds of the invention expressly contemplate, but are not limited to, ADC prepared with cross-linker reagents: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, and sulfo-SMPB, and SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate) which are commercially available (e.g., from Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). See pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

10 v. Preparation of antibody drug conjugates

In the antibody drug conjugates (ADC) of the invention, an antibody (Ab) is conjugated to one or more drug moieties (D), e.g. about 1 to about 20 drug moieties per antibody, through a linker (L). The ADC of Formula I may be prepared by several routes, employing organic chemistry reactions, conditions, and reagents known to those skilled in the art, including: (1) reaction of a nucleophilic group of an antibody with a bivalent linker reagent, to form Ab-L, via a covalent bond, followed by reaction with a drug moiety D; and (2) reaction of a nucleophilic group of a drug moiety with a bivalent linker reagent, to form D-L, via a covalent bond, followed by reaction with the nucleophilic group of an antibody. Additional methods for preparing ADC are described herein.

20



I

The linker may be composed of one or more linker components. Exemplary linker components include 6-maleimidocaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl ("MP"), valine-citrulline ("val-cit"), alanine-phenylalanine ("ala-phe"), p-aminobenzyloxycarbonyl ("PAB"), N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoate ("SPP"), N-Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1 carboxylate ("SMCC"), and N-Succinimidyl (4-iodoacetyl) aminobenzoate ("SIAB"). Additional linker components are known in the art and some are described herein. See also "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004, the contents of which are hereby incorporated by reference in its entirety.

30

In some embodiments, the linker may comprise amino acid residues. Exemplary amino acid linker components include a dipeptide, a tripeptide, a tetrapeptide or a pentapeptide. Exemplary dipeptides include: valine-citrulline (vc or val-cit), alanine-phenylalanine (af or ala-phe). Exemplary tripeptides include: glycine-valine-citrulline

96

(gly-val-cit) and glycine-glycine-glycine (gly-gly-gly). Amino acid residues which comprise an amino acid linker component include those occurring naturally, as well as minor amino acids and non-naturally occurring amino acid analogs, such as citrulline. Amino acid linker components can be designed and optimized in their selectivity for enzymatic cleavage by a particular enzymes, for example, a tumor-associated protease, cathepsin B, C and D, or a plasmin protease.

Nucleophilic groups on antibodies include, but are not limited to: (i) N-terminal amine groups, (ii) side chain amine groups, e.g. lysine, (iii) side chain thiol groups, e.g. cysteine, and (iv) sugar hydroxyl or amino groups where the antibody is glycosylated. Amine, thiol, and hydroxyl groups are nucleophilic and capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups. Certain antibodies have reducible interchain disulfides, i.e. cysteine bridges. Antibodies may be made reactive for conjugation with linker reagents by treatment with a reducing agent such as DTT (dithiothreitol). Each cysteine bridge will thus form, theoretically, two reactive thiol nucleophiles. Additional nucleophilic groups can be introduced into antibodies through the reaction of lysines with 2-iminothiolane (Traut's reagent) resulting in conversion of an amine into a thiol. Reactive thiol groups may be introduced into the antibody (or fragment thereof) by introducing one, two, three, four, or more cysteine residues (e.g., preparing mutant antibodies comprising one or more non-native cysteine amino acid residues).

Antibody drug conjugates of the invention may also be produced by modification of the antibody to introduce electrophilic moieties, which can react with nucleophilic substituents on the linker reagent or drug. The sugars of glycosylated antibodies may be oxidized, e.g. with periodate oxidizing reagents, to form aldehyde or ketone groups which may react with the amine group of linker reagents or drug moieties. The resulting imine Schiff base groups may form a stable linkage, or may be reduced, e.g. by borohydride reagents to form stable amine linkages. In one embodiment, reaction of the carbohydrate portion of a glycosylated antibody with either galactose oxidase or sodium meta-periodate may yield carbonyl (aldehyde and ketone) groups in the protein that can react with appropriate groups on the drug (Hermanson, Bioconjugate Techniques). In another embodiment, proteins containing N-terminal serine or threonine residues can react with sodium meta-periodate, resulting in production of an aldehyde in place of the first amino

97

acid (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Such aldehyde can be reacted with a drug moiety or linker nucleophile.

Likewise, nucleophilic groups on a drug moiety include, but are not limited to: amine, thiol, hydroxyl, hydrazide, oxime, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine
5 carboxylate, and arylhydrazide groups capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups.

Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be
10 made, e.g., by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the conjugate.

In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such
15 streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

Pharmaceutical Formulations

20 Therapeutic formulations comprising an antibody of the invention are prepared for storage by mixing the antibody having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000)), in the form of aqueous solutions, lyophilized or other dried formulations. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to
25 recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, histidine and other organic acids; 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;
30 cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as

28

EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

The formulation herein may also contain more than one active compound as
5 necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsule prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example,
10 hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsule and poly-(methylmethacrylate) microcapsule, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000).

15 The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the immunoglobulin of the invention, which matrices are in the form of shaped
20 articles, e.g., films, or microcapsule. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres
25 composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated immunoglobulins remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C,
30 resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying

209

sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Uses

5 An antibody of the present invention may be used in, for example, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* therapeutic methods.

In one aspect, the invention provides methods for treating or preventing a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder associated with increased expression and/or activity of DLL4, the methods comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

10 In one aspect, the invention provides methods for reducing, inhibiting, blocking, or preventing growth of a tumor or cancer, the methods comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

In one aspect, the invention provides methods for treating a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

15 In one aspect, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment.

In one aspect, the invention provides methods for treating a pathological condition associated with angiogenesis comprising administering an effective amount of an anti-DLL4 antibody to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the pathological condition associated with angiogenesis is a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder. In some embodiments, the pathological condition associated with angiogenesis is an intraocular neovascular disease.

25 Moreover, at least some of the antibodies of the invention can bind antigen from other species. Accordingly, the antibodies of the invention can be used to bind specific antigen activity, e.g., in a cell culture containing the antigen, in human subjects or in other mammalian subjects having the antigen with which an antibody of the invention cross-reacts (e.g. chimpanzee, baboon, marmoset, cynomolgus and rhesus, pig or mouse). In one embodiment, the antibody of the invention can be used for inhibiting antigen activities by contacting the antibody with the antigen such that antigen activity is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule.

30

In one embodiment, an antibody of the invention can be used in a method for binding an antigen in a subject suffering from a disorder associated with increased antigen expression and/or activity, comprising administering to the subject an antibody of the invention such that the antigen in the subject is bound. Preferably, the antigen is a human protein molecule and the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing the antigen with which an antibody of the invention binds. Still further the subject can be a mammal into which the antigen has been introduced (e.g., by administration of the antigen or by expression of an antigen transgene). An antibody of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an antigen with which the immunoglobulin cross-reacts (e.g., a primate, pig or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration).

The antibodies of the invention can be used to treat, inhibit, delay progression of, prevent/delay recurrence of, ameliorate, or prevent diseases, disorders or conditions associated with expression and/or activity of one or more antigen molecules.

Exemplary disorders include carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (e.g., epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, cancer of the urinary tract, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, melanoma, multiple myeloma and B-cell lymphoma, brain, as well as head and neck cancer, and associated metastases. In some embodiments, the cancer is selected from the group consisting of small cell lung cancer, neuroblastomas, melanoma, breast carcinoma, gastric cancer, colorectal cancer (CRC), and hepatocellular carcinoma. In some embodiments, the cancer is selected from the group consisting of non-small cell lung cancer, colorectal cancer and breast carcinoma, including metastatic forms of those cancers.

In certain embodiments, an immunoconjugate comprising an antibody conjugated with one or more cytotoxic agent(s) is administered to the patient. In some embodiments, the immunoconjugate and/or antigen to which it is bound is/are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the target cell to which it binds. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with nucleic acid in the target cell. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with microtubule polymerization. Examples of such cytotoxic agents include any of the chemotherapeutic agents noted herein (such as a maytansinoid, auristatin, dolastatin, or a calicheamicin), a radioactive isotope, or a ribonuclease or a DNA endonuclease.

Antibodies of the invention can be used either alone or in combination with other compositions in a therapy. For instance, an antibody of the invention may be co-administered with another antibody, chemotherapeutic agent(s) (including cocktails of chemotherapeutic agents), other cytotoxic agent(s), anti-angiogenic agent(s), cytokines, and/or growth inhibitory agent(s). Where an antibody of the invention inhibits tumor growth, it may be particularly desirable to combine it with one or more other therapeutic agent(s) which also inhibits tumor growth, e.g. anti-VEGF agents including antibodies to VEGF. Alternatively, or additionally, the patient may receive combined radiation therapy (e.g. external beam irradiation or therapy with a radioactive labeled agent, such as an antibody). Such combined therapies noted above include combined administration (where the two or more agents are included in the same or separate formulations), and separate administration, in which case, administration of the antibody of the invention can occur prior to, and/or following, administration of the adjunct therapy or therapies.

Combination Therapies

As indicated above, the invention provides combined therapies in which an anti-DLL4 antibody is administered with another therapy. For example, anti-DLL4 antibodies are used in combinations with anti-cancer therapeutics or anti-neovascularization therapeutics to treat various neoplastic or non-neoplastic conditions. In one embodiment, the neoplastic or non-neoplastic condition is characterized by pathological disorder associated with aberrant or undesired angiogenesis. The anti-DLL4 antibody can be administered serially or in combination with another agent that is effective for those purposes, either in the same composition or as separate compositions. Alternatively, or additionally, multiple inhibitors of DLL4 can be administered.

The administration of the anti-DLL4 antibody can be done simultaneously, e.g., as a single composition or as two or more distinct compositions using the same or different

102

administration routes. Alternatively, or additionally, the administration can be done sequentially, in any order. In certain embodiments, intervals ranging from minutes to days, to weeks to months, can be present between the administrations of the two or more compositions. For example, the anti-cancer agent may be administered first, followed by the DLL4 inhibitor. However, simultaneous administration or administration of the anti-DLL4 antibody first is also contemplated.

The effective amounts of therapeutic agents administered in combination with an anti-DLL4 antibody will be at the physician's or veterinarian's discretion. Dosage administration and adjustment is done to achieve maximal management of the conditions to be treated. The dose will additionally depend on such factors as the type of therapeutic agent to be used and the specific patient being treated. Suitable dosages for the anti-cancer agent are those presently used and can be lowered due to the combined action (synergy) of the anti-cancer agent and the anti-DLL4 antibody. In certain embodiments, the combination of the inhibitors potentiates the efficacy of a single inhibitor. The term "potentiate" refers to an improvement in the efficacy of a therapeutic agent at its common or approved dose. See also the section entitled Pharmaceutical Compositions herein.

Typically, the anti-DLL4 antibodies and anti-cancer agents are suitable for the same or similar diseases to block or reduce a pathological disorder such as tumor growth or growth of a cancer cell. In one embodiment the anti-cancer agent is an anti-angiogenesis agent.

Antiangiogenic therapy in relationship to cancer is a cancer treatment strategy aimed at inhibiting the development of tumor blood vessels required for providing nutrients to support tumor growth. Because angiogenesis is involved in both primary tumor growth and metastasis, the antiangiogenic treatment provided by the invention is capable of inhibiting the neoplastic growth of tumor at the primary site as well as preventing metastasis of tumors at the secondary sites, therefore allowing attack of the tumors by other therapeutics.

Many anti-angiogenic agents have been identified and are known in the arts, including those listed herein, e.g., listed under Definitions, and by, e.g., Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); and Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). See also, US Patent Application US20030055006. In one embodiment, an anti-DLL4 antibody is used in combination with an anti-VEGF neutralizing antibody (or fragment) and/or another VEGF antagonist or a VEGF receptor antagonist including, but not limited to, for example, soluble VEGF

receptor (e.g., VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropillins (e.g., NRP1, NRP2)) fragments, aptamers capable of blocking VEGF or VEGFR, neutralizing anti-VEGFR antibodies, low molecule weight inhibitors of VEGFR tyrosine kinases (RTK), antisense strategies for VEGF, ribozymes against VEGF or VEGF receptors, antagonist variants of VEGF; and any combinations thereof. Alternatively, or additionally, two or more angiogenesis inhibitors may optionally be co-administered to the patient in addition to VEGF antagonist and other agent. In certain embodiment, one or more additional therapeutic agents, e.g., anti-cancer agents, can be administered in combination with anti-DLL4 antibody, the VEGF antagonist, and an anti-angiogenesis agent.

10 In certain aspects of the invention, other therapeutic agents useful for combination tumor therapy with a anti-DLL4 antibody include other cancer therapies, (e.g., surgery, radiological treatments (e.g., involving irradiation or administration of radioactive substances), chemotherapy, treatment with anti-cancer agents listed herein and known in the art, or combinations thereof). Alternatively, or additionally, two or more antibodies binding the same or two or more different antigens disclosed herein can be co-administered to the patient. Sometimes, it may be beneficial to also administer one or more cytokines to the patient.

Chemotherapeutic Agents

In certain aspects, the invention provides a method of blocking or reducing tumor growth or growth of a cancer cell, by administering effective amounts of an antagonist of DLL4 and/or an angiogenesis inhibitor(s) and one or more chemotherapeutic agents to a patient susceptible to, or diagnosed with, cancer. A variety of chemotherapeutic agents may be used in the combined treatment methods of the invention. An exemplary and non-limiting list of chemotherapeutic agents contemplated is provided herein under

25 "Definitions."

As will be understood by those of ordinary skill in the art, the appropriate doses of chemotherapeutic agents will be generally around those already employed in clinical therapies wherein the chemotherapeutics are administered alone or in combination with other chemotherapeutics. Variation in dosage will likely occur depending on the condition being treated. The physician administering treatment will be able to determine the appropriate dose for the individual subject.

The invention also provides methods and compositions for inhibiting or preventing relapse tumor growth or relapse cancer cell growth. Relapse tumor growth or relapse cancer cell growth is used to describe a condition in which patients undergoing or treated

104

with one or more currently available therapies (e.g., cancer therapies, such as chemotherapy, radiation therapy, surgery, hormonal therapy and/or biological therapy/immunotherapy, anti-VEGF antibody therapy, particularly a standard therapeutic regimen for the particular cancer) is not clinically adequate to treat the patients or the

5 patients are no longer receiving any beneficial effect from the therapy such that these patients need additional effective therapy. As used herein, the phrase can also refer to a condition of the "non-responsive/refractory" patient, e.g., which describe patients who respond to therapy yet suffer from side effects, develop resistance, do not respond to the therapy, do not respond satisfactorily to the therapy, etc. In various embodiments, a cancer

10 is relapse tumor growth or relapse cancer cell growth where the number of cancer cells has not been significantly reduced, or has increased, or tumor size has not been significantly reduced, or has increased, or fails any further reduction in size or in number of cancer cells. The determination of whether the cancer cells are relapse tumor growth or relapse cancer cell growth can be made either *in vivo* or *in vitro* by any method known in the art

15 for assaying the effectiveness of treatment on cancer cells, using the art-accepted meanings of "relapse" or "refractory" or "non-responsive" in such a context. A tumor resistant to anti-VEGF treatment is an example of a relapse tumor growth.

The invention provides methods of blocking or reducing relapse tumor growth or relapse cancer cell growth in a subject by administering one or more anti-DLL4 antibodies

20 to block or reduce the relapse tumor growth or relapse cancer cell growth in subject. In certain embodiments, the antagonist can be administered subsequent to the cancer therapeutic. In certain embodiments, the anti-DLL4 antibodies are administered simultaneously with cancer therapy. Alternatively, or additionally, the anti-DLL4 antibody therapy alternates with another cancer therapy, which can be performed in any

25 order. The invention also encompasses methods for administering one or more inhibitory antibodies to prevent the onset or recurrence of cancer in patients predisposed to having cancer. Generally, the subject was or is concurrently undergoing cancer therapy. In one embodiment, the cancer therapy is treatment with an anti-angiogenesis agent, e.g., a VEGF antagonist. The anti-angiogenesis agent includes those known in the art and those found

30 under the Definitions herein. In one embodiment, the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF neutralizing antibody or fragment (e.g. AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA) or LUCENTIS® (Genentech, South San Francisco, CA)), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). See, e.g., U.S. Patents 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; US Patent Applications 20030206899,

105

20030190317, 20030203409, and 20050112126; Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004); and, WO2005012359. Additional agents can be administered in combination with VEGF antagonist and an anti-DLL4 antibody for blocking or reducing relapse tumor growth or relapse cancer cell growth, e.g., see section
5 entitled Combination Therapies herein.

The antibody of the invention (and adjunct therapeutic agent) is/are administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local treatment, intralesional or intravitreal administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial,
10 intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Dosing can be by any suitable route, e.g. by injections, such as intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

The antibody composition of the invention will be formulated, dosed, and
15 administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The antibody need not be, but is optionally
20 formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of antibodies of the invention present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore
25 employed dosages.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an antibody of the invention (when used alone or in combination with other agents such as chemotherapeutic agents) will depend on the type of disease to be treated, the type of antibody, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for
30 preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 µg/kg to 15 mg/kg (e.g. 0.1mg/kg-10mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient,

whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. One typical daily dosage might range from about 1 µg/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. One exemplary dosage of the antibody would be in the range
5 from about 0.05mg/kg to about 10mg/kg. Thus, one or more doses of about 0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg or 10mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently, *e.g.* every week or every three weeks (*e.g.* such that the patient receives from about two to about twenty, *e.g.* about six
10 doses of the antibody). An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses may be administered. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the antibody. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

15 The anti-DLL4 antibodies of the invention are useful in assays detecting DLL4 expression (such as diagnostic or prognostic assays) in specific cells or tissues wherein the antibodies are labeled as described below and/or are immobilized on an insoluble matrix.

In another aspect, the invention provides methods for detection of DLL4, the methods comprising detecting DLL4-anti-DLL4 antibody complex in the sample. The term
20 "detection" as used herein includes qualitative and/or quantitative detection (measuring levels) with or without reference to a control.

In another aspect, the invention provides methods for diagnosing a disorder associated with DLL4 expression and/or activity, the methods comprising detecting DLL4-anti-DLL4 antibody complex in a biological sample from a patient having or suspected of
25 having the disorder. In some embodiments, the DLL4 expression is increased expression or abnormal (undesired) expression. In some embodiments, the disorder is a tumor, cancer, and/or a cell proliferative disorder.

In another aspect, the invention provides any of the anti-DLL4 antibodies described herein, wherein the anti-DLL4 antibody comprises a detectable label.

30 In another aspect, the invention provides a complex of any of the anti-DLL4 antibodies described herein and DLL4. In some embodiments, the complex is *in vivo* or *in vitro*. In some embodiments, the complex comprises a cancer cell. In some embodiments, the anti-DLL4 antibody is detectably labeled.

107

Anti-DLL4 antibodies can be used for the detection of DLL4 in any one of a number of well known detection assay methods. For example, a biological sample may be assayed for DLL4 by obtaining the sample from a desired source, admixing the sample with anti-DLL4 antibody to allow the antibody to form antibody/ DLL4 complex with any
5 DLL4 present in the mixture, and detecting any antibody/ DLL4 complex present in the mixture. The biological sample may be prepared for assay by methods known in the art which are suitable for the particular sample. The methods of admixing the sample with antibodies and the methods of detecting antibody/ DLL4 complex are chosen according to the type of assay used. Such assays include immunohistochemistry, competitive and
10 sandwich assays, and steric inhibition assays.

Analytical methods for DLL4 all use one or more of the following reagents: labeled DLL4 analogue, immobilized DLL4 analogue, labeled anti-DLL4 antibody, immobilized anti-DLL4 antibody and steric conjugates. The labeled reagents also are known as "tracers."

15 The label used is any detectable functionality that does not interfere with the binding of DLL4 and anti-DLL4 antibody. Numerous labels are known for use in immunoassay, examples including moieties that may be detected directly, such as fluorochrome, chemiluminescent, and radioactive labels, as well as moieties, such as enzymes, that must be reacted or derivatized to be detected. Examples of such labels
20 include:

The label used is any detectable functionality that does not interfere with the binding of DLL4 and anti-DLL4 antibody. Numerous labels are known for use in immunoassay, examples including moieties that may be detected directly, such as fluorochrome, chemiluminescent, and radioactive labels, as well as moieties, such as
25 enzymes, that must be reacted or derivatized to be detected. Examples of such labels include the radioisotopes ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, and ¹³¹I, fluorophores such as rare earth chelates or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, umbelliferone, luciferases, e.g., firefly luciferase and bacterial luciferase (U.S. Pat. No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, horseradish peroxidase (HRP), alkaline
30 phosphatase, β-galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases, e.g., glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase, heterocyclic oxidases such as uricase and xanthine oxidase, coupled with an enzyme that employs hydrogen peroxide to oxidize a dye precursor such as HRP, lactoperoxidase, or microperoxidase, biotin/avidin, spin labels, bacteriophage labels, stable free radicals, and the like.

Conventional methods are available to bind these labels covalently to proteins or polypeptides. For instance, coupling agents such as dialdehydes, carbodiimides, dimaleimides, bis-imidates, bis-diazotized benzidine, and the like may be used to tag the antibodies with the above-described fluorescent, chemiluminescent, and enzyme labels.

5 See, for example, U.S. Pat. Nos. 3,940,475 (fluorimetry) and 3,645,090 (enzymes); Hunter *et al.*, *Nature*, **144**: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, **13**: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **40**: 219-230 (1981); and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, **30**: 407-412 (1982). Preferred labels herein are enzymes such as horseradish peroxidase and alkaline phosphatase. The conjugation of such label, including the enzymes, to the
10 antibody is a standard manipulative procedure for one of ordinary skill in immunoassay techniques. See, for example, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

15 Immobilization of reagents is required for certain assay methods. Immobilization entails separating the anti-DLL4 antibody from any DLL4 that remains free in solution. This conventionally is accomplished by either insolubilizing the anti-DLL4 antibody or DLL4 analogue before the assay procedure, as by adsorption to a water-insoluble matrix or surface (Bennich *et al.*, U.S. 3,720,760), by covalent coupling (for example, using
20 glutaraldehyde cross-linking), or by insolubilizing the anti-DLL4 antibody or DLL4 analogue afterward, e.g., by immunoprecipitation.

The expression of proteins in a sample may be examined using immunohistochemistry and staining protocols. Immunohistochemical staining of tissue sections has been shown to be a reliable method of assessing or detecting presence of
25 proteins in a sample. Immunohistochemistry ("IHC") techniques utilize an antibody to probe and visualize cellular antigens *in situ*, generally by chromogenic or fluorescent methods. For sample preparation, a tissue or cell sample from a mammal (typically a human patient) may be used. Examples of samples include, but are not limited to, cancer cells such as colon, breast, prostate, ovary, lung, stomach, pancreas, lymphoma, and
30 leukemia cancer cells. The sample can be obtained by a variety of procedures known in the art including, but not limited to surgical excision, aspiration or biopsy. The tissue may be fresh or frozen. In one embodiment, the sample is fixed and embedded in paraffin or the like. The tissue sample may be fixed (*i.e.* preserved) by conventional methodology. One of ordinary skill in the art will appreciate that the choice of a fixative is determined by

the purpose for which the sample is to be histologically stained or otherwise analyzed. One of ordinary skill in the art will also appreciate that the length of fixation depends upon the size of the tissue sample and the fixative used.

IHC may be performed in combination with additional techniques such as morphological staining and/or fluorescence *in-situ* hybridization. Two general methods of IHC are available; direct and indirect assays. According to the first assay, binding of antibody to the target antigen (e.g., DLL4) is determined directly. This direct assay uses a labeled reagent, such as a fluorescent tag or an enzyme-labeled primary antibody, which can be visualized without further antibody interaction. In a typical indirect assay, unconjugated primary antibody binds to the antigen and then a labeled secondary antibody binds to the primary antibody. Where the secondary antibody is conjugated to an enzymatic label, a chromogenic or fluorogenic substrate is added to provide visualization of the antigen. Signal amplification occurs because several secondary antibodies may react with different epitopes on the primary antibody.

The primary and/or secondary antibody used for immunohistochemistry typically will be labeled with a detectable moiety. Numerous labels are available which can be generally grouped into the following categories:

Aside from the sample preparation procedures discussed above, further treatment of the tissue section prior to, during or following IHC may be desired. For example, epitope retrieval methods, such as heating the tissue sample in citrate buffer may be carried out (see, e.g., Leong *et al. Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Following an optional blocking step, the tissue section is exposed to primary antibody for a sufficient period of time and under suitable conditions such that the primary antibody binds to the target protein antigen in the tissue sample. Appropriate conditions for achieving this can be determined by routine experimentation. The extent of binding of antibody to the sample is determined by using any one of the detectable labels discussed above. Preferably, the label is an enzymatic label (e.g. HRPO) which catalyzes a chemical alteration of the chromogenic substrate such as 3,3'-diaminobenzidine chromogen. Preferably the enzymatic label is conjugated to antibody which binds specifically to the primary antibody (e.g. the primary antibody is rabbit polyclonal antibody and secondary antibody is goat anti-rabbit antibody).

Specimens thus prepared may be mounted and coverslipped. Slide evaluation is then determined, e.g. using a microscope, and staining intensity criteria, routinely used in the art, may be employed. Staining intensity criteria may be evaluated as follows:

110

TABLE 2

Staining Pattern	Score
No staining is observed in cells.	0
Faint/barely perceptible staining is detected in more than 10% of the cells.	1+
Weak to moderate staining is observed in more than 10% of the cells.	2+
Moderate to strong staining is observed in more than 10% of the cells.	3+

Typically, a staining pattern score of about 2+ or higher in an IHC assay is
5 diagnostic and/or prognostic. In some embodiments, a staining pattern score of about 1+ or higher is diagnostic and/or prognostic. In other embodiments, a staining pattern score of about 3 or higher is diagnostic and/or prognostic. It is understood that when cells and/or tissue from a tumor or colon adenoma are examined using IHC, staining is generally determined or assessed in tumor cell and/or tissue (as opposed to stromal or surrounding
10 tissue that may be present in the sample).

Other assay methods, known as competitive or sandwich assays, are well established and widely used in the commercial diagnostics industry.

Competitive assays rely on the ability of a tracer DLL4 analogue to compete with the test sample DLL4 for a limited number of anti-DLL4 antibody antigen-binding sites.
15 The anti-DLL4 antibody generally is insolubilized before or after the competition and then the tracer and DLL4 bound to the anti-DLL4 antibody are separated from the unbound tracer and DLL4. This separation is accomplished by decanting (where the binding partner was preinsolubilized) or by centrifuging (where the binding partner was precipitated after the competitive reaction). The amount of test sample DLL4 is inversely proportional to the
20 amount of bound tracer as measured by the amount of marker substance. Dose-response curves with known amounts of DLL4 are prepared and compared with the test results to quantitatively determine the amount of DLL4 present in the test sample. These assays are called ELISA systems when enzymes are used as the detectable markers.

Another species of competitive assay, called a "homogeneous" assay, does not
25 require a phase separation. Here, a conjugate of an enzyme with the DLL4 is prepared and used such that when anti-DLL4 antibody binds to the DLL4 the presence of the anti-DLL4 antibody modifies the enzyme activity. In this case, the DLL4 or its immunologically

active fragments are conjugated with a bifunctional organic bridge to an enzyme such as peroxidase. Conjugates are selected for use with anti-DLL4 antibody so that binding of the anti-DLL4 antibody inhibits or potentiates the enzyme activity of the label. This method *per se* is widely practiced under the name of EMIT.

- 5 Steric conjugates are used in steric hindrance methods for homogeneous assay. These conjugates are synthesized by covalently linking a low-molecular-weight hapten to a small DLL4 fragment so that antibody to hapten is substantially unable to bind the conjugate at the same time as anti-DLL4 antibody. Under this assay procedure the DLL4 present in the test sample will bind anti-DLL4 antibody, thereby allowing anti-hapten to
10 bind the conjugate, resulting in a change in the character of the conjugate hapten, e.g., a change in fluorescence when the hapten is a fluorophore.

- Sandwich assays particularly are useful for the determination of DLL4 or anti-DLL4 antibodies. In sequential sandwich assays an immobilized anti-DLL4 antibody is used to adsorb test sample DLL4, the test sample is removed as by washing, the bound
15 DLL4 is used to adsorb a second, labeled anti-DLL4 antibody and bound material is then separated from residual tracer. The amount of bound tracer is directly proportional to test sample DLL4. In "simultaneous" sandwich assays the test sample is not separated before adding the labeled anti-DLL4. A sequential sandwich assay using an anti-DLL4 monoclonal antibody as one antibody and a polyclonal anti-DLL4 antibody as the other is
20 useful in testing samples for DLL4.

 The foregoing are merely exemplary detection assays for DLL4. Other methods now or hereafter developed that use anti-DLL4 antibody for the determination of DLL4 are included within the scope hereof, including the bioassays described herein.

Articles of Manufacture

- 25 In another aspect of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment, prevention and/or diagnosis of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or
30 plastic. The container holds a composition which is by itself or when combined with another composition(s) effective for treating, preventing and/or diagnosing the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an antibody of the invention. The label or

package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice, such as cancer. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody of the invention; and (b) a second container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a further therapeutic agent, including, e.g. a chemotherapeutic agent or an anti-angiogenesis agent, including, e.g., an anti-VEGF antibody (e.g. bevacizumab). The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprise a package insert indicating that the first and second antibody compositions can be used to treat a particular condition, e.g. cancer. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

The following are examples of the methods and compositions of the invention. It is understood that various other embodiments may be practiced, given the general description provided above.

EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the Examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following Examples, and throughout the specification, by ATCC® accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108. References cited in the Examples are listed following the examples. All references cited herein are hereby incorporated by reference.

Example 1: Materials and methods

The following materials and methods were used in the Examples.

HUVEC fibrin gel bead assay. Details of the HUVEC fibrin gel bead assay have been described (Nakatsu, M. N. et al. *Microvasc Res* 66, 102-12 (2003)). Briefly, Cytodex™ 3 beads (Amersham Pharmacia Biotech) were coated with 350-400 HUVECs per bead. About 200 HUVEC-coated beads were imbedded in fibrin clot in one well of 12-well tissue culture plate. 8×10^4 SF cells were plated on top of the clot. Assays were terminated between day 7 and day 9 for immunostaining and imaging. In some

experiments, HUVEC sprouts were visualized by staining with Biotin-anti-CD31 (clone WM59, eBioscience) and streptavidin-Cy3. For HUVEC nuclei staining, fibrin gels were fixed overnight in 2% paraformaldehyde (PFA), and stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma). For Ki67 staining, fibrin gels were treated with 10X trypsin-EDTA for 5 min to remove the top layer SF, neutralized with 10% FBS in PBS, and fixed overnight in 4% PFA. Fibrin gels were then blocked with 10% goat serum in PBST for 4 hr, incubated overnight with rabbit anti-mouse Ki67 (Ready-To-Use, clone Sp6, LabVision), followed by secondary detection with anti-rabbit IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch). All overnight incubations were done at 4°C.

- 10 **Mouse neonatal retina study.** Neonatal CD1 mice from the same litters were injected i.p. with PBS or YW26.82 (10 mg/kg) on P1 and P3. Eyes were collected on P5, and fixed with 4% PFA in PBS overnight. The dissected retinas were blocked with 10% goat serum in PBST for 3 hrs, then incubated overnight with primary antibodies. The primary cocktail included biotinylated isolectin B4 (25 µg/ml, *Bandeiraea simplicifolia*;
15 Sigma), and one of the following: rabbit anti-mouse Ki67 (1:1, ready-to-use, clone Sp6, Lab Vision), or mouse Cy3-conjugated anti-alpha SMA (1:2000, Sigma-Aldrich), with 10% serum in PBLEC (1% Triton X-100, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM MnCl₂, in PBS pH6.8). Retinas were then washed in PBST, and incubated overnight with secondary antibody combination of Alexa Fluor® 488 streptavidin (1:200; Molecular
20 Probes) and Cy3-anti-rabbit IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch). After staining was completed, retinas were post fixed with 4% PFA in PBS. All overnight incubations were done at 4°C. Images of flat mounted retinas were captured by confocal fluorescence microscopy.

- Tumor models.** Beige nude female mice of 8- to 10-week-old were used. To obtain
25 subcutaneous tumors, mice were injected with 0.1 ml cell suspension containing 50% matrigel (BD Bioscience) into the right posterior flank. 5X10⁶ human colon cancer HM7 cells, 10X10⁶ human colon carcinoma Colo205 cells, 10X10⁶ human lung carcinoma Calu6 cells, 10X10⁶ human lung carcinoma MV-522 cells, 10X10⁶ mouse leukemia WEHI-3 cells, 10X10⁶ mouse lymphoma EL4 cells, 10X10⁶ human ovarian cancer SK-
30 OV-3 X1 cells, 10X10⁶ mouse lung cancer LL2 cells, 10X10⁶ leukemia/lymphoma EL4 cells, or 10X10⁶ non-small lung cancer H1299 cells were injected into each mouse. For human melanoma MDA-MB-435 model, mice were injected into the mammary fat pad with 0.1 ml cell (5X10⁶) suspension containing 50% matrigel. Anti-DLL4 antibody YW26.82 was administered via i.p. (10 mg/kg body weight, twice weekly). For the

following tumor models, each test mouse received a subcutaneous tumor fragment (1 mm³) implanted in the right flank: non-small lung cancer SKMES-1, human breast cancer MX-1, human colorectal cancer SW620 and human adenocarcinoma LS174T. The tumor growth was quantitated by caliper measurements. Tumor volume (mm³) was determined by measuring the length (*l*) and width (*w*) and calculating the volume ($V = lw^2/2$). 10 to 15 animals were included in each group. Statistical comparison of treatment groups was performed using two-tailed Student's t-test.

Tumor vascular labeling and immunohistochemistry. Mice were anesthetized with Isoflurane. FITC-labeled *Lycopersicon esculentum* Lectin (150 µg in 150 µl of 0.9% NaCl; Vector Laboratories) was injected i.v. and allowed to circulate for 5 min before systemic perfusion. The vasculature was perfused transcardially with 1% PFA in PBS for 3 min. Tumors were removed and post fixed by immersion in the same fixative for 2 hr, followed by an incubation in 30% sucrose overnight for cryoprotection, then embedded in OCT. Sections (4µm thickness) were stained with anti-mouse CD31 (1:50, BD Pharmingen), followed by Alexa 594 goat anti-rat IgG (1:800, Molecular Probes).

Histology and immunohistochemistry of mouse intestines. Formalin-fixed and paraffin-embedded mouse small intestine tissues were sectioned at 3 µm thickness. Histochemical identification of intestinal cell types was performed with Alcian blue as recommended by the manufacturer (PolyScientific). For anti-Ki67 staining, sections were pretreated with Target Retrieval Solution (S1700, DAKO), and incubated with rabbit anti-Ki67 (1:200, clone SP6, Neomarkers). Secondary goat anti-rabbit at 7.5g/ml (Vector labs) was detected with the Vectastain ABC Elite Kit (Vector labs). All Ki67 stained sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. For HES-1 staining, anti-rat HES-1 (clone NM1, MBL, International), followed by TSA-HRP, was used.

RNA interference. SMARTpool small interfering RNA (siRNA) duplexes targeting human DLL4 and Si Control Non-Target siRNA #2 were purchased from Dharmacon. Transfection of siRNR duplexes (50 nM) was done with HUVECs at 40% confluency using OptiMEM-1® and Lipfectamine™ 2000 (Invitrogen). FACS analysis was done 48 hr after siRNA transfection. The sequences of the 4 anti-DLL4 SMART pool siRNA were as follows:

CAACTGCCCTTATGGCTTTT (SEQ ID NO: 62) (Oligo 1, sense),
AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT (SEQ ID NO: 63) (Oligo 1, antisense),
CAACTGCCCTTCAATTTTCATT (SEQ ID NO: 64) (Oligo 2, sense),
TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT (SEQ ID NO: 65) (Oligo 2, antisense),

TGACCAAGATCTCAACTACTT (SEQ ID NO: 66) (Oligo 3, sense),
GTAGTTGAGATCTTGGTCATT (SEQ ID NO: 67) (Oligo 3, antisense),
GGCCAACTATGCTTGTGAATT (SEQ ID NO: 68) (Oligo 4, sense),
TTCACAAGCATAGTTGGCCTT (SEQ ID NO: 69) (Oligo 4, antisense).

5 **Notch ligand : Notch blocking ELISA.** 96-well microtiter plates were coated with recombinant rat Notch1-Fc (rrNotch1-Fc, R&D Systems) at 0.5 µg/ml. Conditioned medium containing DLL4-AP (amino acid 1-404 of DLL4 fused to human placenta alkaline phosphatase) was used in the assay. To prepare conditioned medium, 293 cells were transiently transfected with plasmid expressing DLL4-AP with Fugen6 reagent
10 (Roche Molecular Biochemicals). Five days posttransfection, the conditioned medium was harvested, filtered and stored at 4°C. Purified antibodies titrated from 0.15 to 25 µg/ml were preincubated for 1hr at room temperature with DLL4-AP conditioned medium at a dilution that conferred 50% maximally achievable binding to coated rrNotch1-Fc. The antibody/DLL4-AP mixture was then added to rrNotch1-Fc coated plate for 1hr at room
15 temperature, after which plates were washed several times in PBS. The bound DLL4-AP was detected using 1-Step PNPP (Pierce) as substrate and OD 405 nm absorbance measurement. Identical assay was performed with DLL1-AP (human DLL1, amino acid 1-445). Similar assays were carried out with purified DLL4-His (C-terminal His-tagged human DLL4, amino acid 1-404) and Jag1-His (R& D system). The bound His-tagged
20 ligands was detected with mouse anti-His mAb (1 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals), biotinylated goat-anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) and Streptavidin-AP (Jackson ImmunoResearch).

RNA extraction and Real-time quantitative RT-PCR. Extraction of total RNA from HUVECs in 2-D culture was done using RNeasy® Mini Kit (Qiagen) as per
25 instructions of the manufacturer. To extract total RNA from HUVECs growing in fibrin gels, fibrin gels were treated with 10X trypsin-EDTA (Gibco) for 5 min to remove the top layer fibroblasts, followed by neutralization with 10% FBS in PBS. The gel clots were then removed from tissue culture wells and subjected to centrifugation (10K for 5 min) in microtubes to remove excessive fluid. The resulting gel "pellets" were lysed with lysis
30 buffer (RNeasy® Mini Kit), and further processed as with HUVECs in 2-D culture. The quality of RNA was assessed using RNA 6000 Nano Chips and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Real-time quantitative RT-PCR reactions were done in triplicate using 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Human GAPDH was used as reference gene for normalization. The expression levels are expressed as the

mean ($\pm$ SEM) fold mRNA changes relative to control from 3 separate determinations. The forward and reverse primer and probe sequences for VEGFR2, TGF β 2 and GAPDH were as follows.

TGF β 2

- 5 Forward: GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (SEQ ID NO: 70)
Reverse: CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (SEQ ID NO: 71)
Probe: AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (SEQ ID NO: 72)

VEGFR2

- Forward: CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (SEQ ID NO: 73)
10 Reverse: TGC AGT CCG AGG TCC TTT (SEQ ID NO: 74)
Probe: CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (SEQ ID NO: 75)

GAPDH

- Forward: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (SEQ ID NO: 76)
Reverse: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (SEQ ID NO: 77)
15 Probe: CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (SEQ ID NO: 78)

Example 2: Generation of phage anti-DLL4 antibodies

- Synthetic phage antibody libraries were built on a single framework (humanized anti-ErbB2 antibody, 4D5) by introducing diversity within the complementarity-determining regions (CDRs) of heavy and light chains (Lee, C. V. et al. *J Mol Biol* 340, 1073-93 (2004); Liang, W. C. et al. *J Biol Chem* 281, 951-61 (2006)). Plate panning with
20 naïve libraries was performed against His-tagged human DLL4 (amino acid 1-404) immobilized on MaxiSorp™ immunoplates. After four rounds of enrichment, clones were randomly picked and specific binders were identified using phage ELISA. The resulting hDLL4 binding clones were further screened with His-tagged murine DLL4 protein to
25 identify cross-species clones. For each positive phage clone, variable regions of heavy and light chains were subcloned into pRK expression vectors that were engineered to express full-length IgG chains. Heavy chain and light chain constructs were co-transfected into 293 or CHO cells, and the expressed antibodies were purified from serum-free medium using protein A affinity column. Purified antibodies were tested by ELISA for blocking the
30 interaction between DLL4 and rat Notch1-Fc, and by FACS for binding to stable cell lines expressing either full-length human DLL4 or murine DLL4. For affinity maturation, phage libraries with three different combination of CDR loops (CDR-L3, -H1, and -H2) derived from the initial clone of interest were constructed by soft randomization strategy so that each selected position was mutated to a non-wild type residue or maintained as wild type at

about 50:50 frequency (Liang et al., 2006, above). High affinity clones were then identified through four rounds of solution phase panning against both human and murine His-tagged DLL4 proteins with progressively increased stringency.

Example 3: Characterization of anti-DLL4 antibodies

5 To determine the binding affinity of the anti-DLL4 Mabs, surface plasmon resonance (SRP) measurement with a BIAcore™-3000 was used (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) were activated with N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Anti-
10 DLL4 antibody was diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5µg/ml before injection at a flow rate of 5µl/minute to achieve approximately 500 response units (RU) of coupled antibody. Next, 1M ethanolamine was injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of either human or murine DLL4-His molecules (0.7nM to 500nM) were injected in PBS with 0.05% Tween™ 20 at 25°C at a
15 flow rate of 25µl/min. Association rates (kon) and dissociation rates (koff) were calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2). The equilibrium dissociation constant (Kd) was calculated as the ratio koff/kon. The results of this experiment are shown in Table 3. Antibody YW26.81 exhibited similar Kd values against human and murine DLL4 (Kd values of 0.1 nM5 and 0.09 nM,
20 respectively), enabling its evaluation in mouse models.

TABLE 3: Binding affinity and kinetics of anti-DLL4 antibodies to human and mouse DLL4. "NA" signifies that the measurement was not performed.

Clone	murine Delta4 (ECD5.5)			human Delta4 (ECD5.5)		
	kon/10 ⁵	koff/10 ⁻⁴	Kd(nM)	kon/10 ⁵	koff/10 ⁻⁴	Kd(nM)
YW26	0.57	16	28	0.3	7.4	25
YW26.6	4.1	0.61	0.15	2	0.49	0.25
YW26.14	3.3	0.73	0.22	1.8	0.66	0.37
YW26.20	3.3	1	0.3	1.7	0.79	0.46
YW26.34	3.6	0.65	0.18	1.9	0.67	0.35
YW26.82	5.4	0.46	0.09	2.4	0.37	0.15

Example 4: Further characterization of anti-DLL4 antibody

Epitope mapping of anti-DLL4 Mab YW26.82: Anti-DLL4 Mab 26.82 recognized a binding determinant present in EGF-like repeat number 2 (EGL2) of the human DLL4 extracellular domain (ECD). EGL2 comprises amino acids 252-282 of the human DLL4 ECD. Briefly, DLL4 ECD mutants were expressed as alkaline phosphatase fusion proteins and binding to antibody as assessed. Fig 11a depicts a schematic representation of a set of DLL4 mutants expressed as C-terminal human placental alkaline phosphatase (AP) fusion proteins. Parentheses indicate DLL4 sequences included in the fusion proteins. 293T cell conditioned media containing the fusion proteins were tested on 96-well microtiter plates coated with purified anti-DLL4 Mab (YW26.82, 0.5 µg/ml). The bound DLL4.AP was detected using 1-Step PNPP (Pierce) as substrate and OD 405 nm absorbance measurement. Mab YW26.82 bound constructs comprising the DLL4 EGL2 domain and did not bind a construct lacking the DLL4 EGL2 domain. This demonstrated that anti-DLL4 Mab YW 26.82 recognized an epitope in the EGL2 domain of the human DLL4 ECD.

Mab YW26.82 selectively binds to mouse and human DLL4. 96-well Nunc Maxisorp plates were coated with purified recombinant proteins as indicated (1 µg/ml). The binding of YW26.82 at indicated concentrations was measured by ELISA assay. Bound antibodies were detected with anti-human antibody HRP conjugate using TMB as substrate and OD 450 nm absorbance measurement. Anti-HER2 and recombinant ErbB2-ECD were used as assay control (Figure 11b). The results of this experiment are shown in Figure 11b. The Mab YW26.82 bound human and mouse DLL4, and did not detectably

bind to human DLL1 and human JAG1. These results demonstrated that Mab YW26.82 selectively binds to DLL4.

FACS analysis of 293 cells transiently transfected with vector, full length DLL4, Jag1 or DLL1 also demonstrated that Mab YW26.82 selectively bound to DLL4. As shown in Figure 11c, significant binding of YW26.82 was only detected on DLL4 transfected cells (top panel). Significant binding was not detected on DLL1 or Jag1 transfected cells. Expression of Jag1 and DLL1 was confirmed by the binding of recombinant rat Notch1-Fc (rrNotch1-Fc, middle panel) and recombinant rat Notch2-Fc (rrNotch2-Fc, bottom panel), respectively. YW26.82, rrNotch1-Fc or rrNotch2-Fc (R& D system) were used at 2 µg/ml followed by goat anti-human IgG-PE (1:500, Jackson ImmunoResearch).

Competition experiments demonstrated that Mab YW26.82 effectively and selectively blocked the interaction of Notch with DLL4, but not other Notch ligands. As shown in Figure 11d, anti-DLL4 Mab blocked the binding of DLL4-AP, but not DLL1-AP, to coated rNotch1, with a calculated IC50 of ~12 nM (left panel). Anti-DLL4 Mab blocked the binding of DLL4-His, but not Jag1-His, to coated rNotch1, with a calculated IC50 of ~8 nM (right panel).

Anti-DLL4 Mab YW26.82 specifically bound to endogenously expressed DLL4 in Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). FACS analysis of HUVECs transfected with control or DLL4-specific siRNA. YW26.82 was used at 2 µg/ml, followed by goat anti-human IgG-PE (1:500, Jackson ImmunoResearch). The results of this experiment are shown in Figure 11e. Binding was observed to untransfected HUVECs (control) and to HUVECs transfected with a control siRNA. By contrast, binding was significantly reduced in HUVECs transfected with DLL4 siRNA. These experiments demonstrated that anti-DLL4 Mab YW26.82 specifically binds to endogenously expressed DLL4 in HUVEC.

Example 5: Treatment with anti-DLL4 antibody increased endothelial cell proliferation *in vitro*

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) growing in fibrin gels in the presence of co-cultured human skin fibroblast (SF) cells generate sprouts with a distinct lumen-like structure (Nakatsu, M. N. et al. *Microvasc Res* 66, 102-12 (2003)). Addition of anti-DLL4 antibody YW26.82 markedly increased the length and number of sprouts (Fig. 7a). Proteolytic processing of Notch, catalyzed by the γ-secretase activity of a protein complex, is an essential step during Notch activation (Baron, M. *Semin Cell Dev Biol* 14,

113-9 (2003)). Interestingly, the γ -secretase inhibitor dibenzazepine (DBZ) (van Es, J. H. et al. *Nature* 435, 959-63 (2005); Milano, J. et al. *Toxicol Sci* 82, 341-58 (2004)) had the same effect on HUVEC sprouting. Given the distinct mechanisms of these two treatments, the enhanced sprouting was clearly attributable to the attenuation of Notch signaling. Ki67 staining revealed that the enhanced EC sprouting was due to elevated cell proliferation (Fig. 7b). In the original fibrin gel assay, HUVEC sprouting and subsequent lumen formation are supported by cocultured SF cells. By replacing SF cells with conditioned medium, both anti-DLL4 Mab and DBZ were still able to enhance HUVEC sprouting (Fig. 1c), supporting an EC autonomous role of DLL4/Notch signaling. In the converse experiment, activation of Notch by immobilized DLL4 protein resulted in significant growth inhibition (Fig. 7c). These findings suggest that the activation status of DLL4/Notch signaling is closely associated with EC proliferation.

Example 6: Treatment with anti-DLL4 antibody increased endothelial cell proliferation *in vivo*

Early postnatal mouse retina develops a stereotypic vascular pattern in a well-defined sequence of events (Stone, J. & Dreher, Z. *J Comp Neurol* 255, 35-49 (1987); Gerhardt, H. et al. *J Cell Biol* 161, 1163-77 (2003); Fruttiger, M. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 522-7 (2002)). Prominent and dynamic expression of DLL4 in growing ECs in the neonatal retinas suggests a possible role for DLL4 to regulate retinal vascular development (Claxton, S. & Fruttiger, M. *Gene Expr Patterns* 5, 123-7 (2004)). Systemic delivery of YW26.82 caused a profound alteration of retinal vasculature. A massive accumulation of ECs occurred in the retina, generating a sheet-like structure with primitive vascular morphology (Fig. 7d). A significant increase of Ki67 labeling in ECs was observed, indicating elevated EC proliferation (Fig. 7h). Therefore, this hyperproliferative phenotype of retinal ECs upon DLL4 blockade in neonatal mice corroborated the *in vitro* findings.

Example 7: Essential role of DLL4/Notch in regulating epithelial cell proliferation

VEGF controls several fundamental aspects of ECs (Ferrara, N. *Exs*, 209-31 (2005); Coultas, L. et al. *Nature* 438, 937-45 (2005)). It's less understood, however, how VEGF signaling is integrated into the complex vascular processes, such as arteriovenous (AV) differentiation and hierarchical vascular organization, events evidently demanding additional highly coordinated signaling pathways. Genetic studies in zebra fish suggest that VEGF acts upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation (Lawson, N. D. et al. *Development* 128, 3675-83 (2001)). We found that VEGF stimulation

of HUVEC caused increased surface expression of DLL4 (data not shown), consistent with a recent report on the upregulation of DLL4 mRNA by VEGF stimulation (Patel, N. S. et al. *Cancer Res* 65, 8690-7 (2005)). Intriguingly, DLL4 itself is upregulated following Notch activation (Figure 12), suggesting a positive-feedback mechanism by which DLL4 effectively relays VEGF signaling to Notch pathway. Briefly, HUVECs were stimulated by immobilized C-terminal His-tagged human DLL4 (amino acids 1-404) in the absence or presence of DBZ (0.08 μ M). 36 hr after stimulation, endogenous DLL4 expression was examined by FACS analysis with anti-DLL4 antibody.

Notably, the hyperproliferation of ECs resulting from blocking Notch signaling was still dependent on VEGF. In the 3-D fibrin gel culture, treatment with anti-VEGF Mab abolished most of the EC sprouting, either in the presence or absence of DBZ (Fig. 7f), raising the possibility that the hyperproliferative behavior could be in part due to enhanced VEGF signaling. Indeed, blocking of Notch by YW26.82 or DBZ resulted in upregulation of VEGFR2 (Fig. 7g). Conversely, activation of Notch by immobilized DLL4 suppressed the expression of VEGFR2 (Fig. 7g). Therefore, while VEGF can act upstream of DLL4/Notch pathway, DLL4/Notch is capable of fine-tuning the response through negatively regulating VEGFR2 expression.

Example 8: Treatment with anti-DLL4 antibody blocked endothelial cell differentiation and blocked arterial development

Besides the increase in EC proliferation, antagonizing DLL4/Notch caused a dramatic morphological change of EC sprouts in fibrin gel. The multicellular lumen-like structures were mostly absent (Fig. 8a), suggesting defective EC differentiation. In the Mab YW26.82-treated retinas, the characteristic pattern of radially alternating arteries and veins was severely disrupted. Anti- α smooth muscle actin (ASMA) staining, which is associated with the retinal arteries, was completely absent (Fig. 8c). This observation was remarkably similar to the defective arterial development in DLL4^{+/−} embryos. These findings, from different angles, highlighted the essential role of DLL4/Notch in regulating EC differentiation.

Example 9: TGF β expression was linked to activation status of Notch

Similar to Notch pathway, TGF β signaling is context dependent and has diverse and often opposing effects on cell differentiation, proliferation and growth inhibition. Moreover, the TGF β pathway has been implicated in vascular processes (Urness, L. D. et al, *Nat Genet* 26, 328-31 (2000); Oshima, M. et al, *Dev Biol* 179, 297-302 (1996); Larsson, J. et al. *Embo J* 20, 1663-73 (2001)). For instance, deficiency of Activin receptor-like

kinase 1 (ALK1), an EC specific type I TGF β receptor, resulted in a primitive EC network in the yolk sacs and arteriovenous malfunction (AVM), a phenotype shared by mice with defective Notch signaling (Urness, L. D. et al, *Nat Genet* 26, 328-31 (2000); Iso, T. et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 543-53 (2003)). This led us to investigate the possible connection between these two pathways. We found that the expression of TGF β 2 (Fig. 8b) was tightly linked to the activation status of Notch, suggesting that TGF β pathway could act downstream of Notch pathway. Together, our findings support a model wherein the DLL4/Notch axis, serving as a "signaling router", integrates VEGF signaling through regulating DLL4 expression and engages TGF β pathway to promote EC differentiation.

Example 10: Treatment with anti-DLL4 antibody inhibited tumor growth *in vivo*

To directly address the possible role of DLL4/Notch signaling during tumor angiogenesis, we investigated the impact of blocking DLL4 on tumor growth in preclinical tumor models (Figs. 9a-d). In HM7, Colo205 and Calu6 xenograft tumor models (Figs. 9a-c), YW26.82 treatment was initiated after tumor establishment ($\geq 250 \text{ mm}^3$ in tumor size). In all three models, a separation in growth rates between the control and treatment groups became evident three days after dosing. The tumor volume of the treatment group remained static over two weeks of treatment. In addition to subcutaneous tumors, anti-DLL4 Mab also inhibited tumors growing in mouse mammary fat pads. In the MDA-MB-435 tumor model, treatment was started 14 days post tumor cell injection. A difference in tumor growth curves between the control and treatment groups was evident within six days after dosing and became increasingly significant as treatment continued (Fig. 9d).

We also investigated the impact of blocking DLL4 and/or VEGF on numerous tumor growth in preclinical tumor models (Figs. 9c-f, i-p). In MV-522 and WEHI3 xenograft tumor models, YW26.82 treatment and/or anti-VEGF treatment was initiated after tumor establishment ($\geq 250 \text{ mm}^3$ in tumor size). In the MV-522 model, both YW26.82 and anti-VEGF treatment inhibited tumor growth individually, but the combination of the two treatments was most effective. In the WEHI3 model, anti-VEGF treatment showed no effect on tumor growth whereas treatment with YW26.82 showed significant inhibition of tumor growth. In the SK-OV-3X1, LL2, EL4, H1299, SKMES-1, MX-1, SW620 and LS174T models, YW26.82 treatment (5 mg/kg, IP, twice weekly) and/or anti-VEGF treatment (5 mg/kg, IP, twice weekly) was administered after establishment of the tumors. In each of these models, YW26.82 treatment inhibited tumor growth alone. Furthermore,

in all of these models where the combination was tested, YW26.82 exhibited enhanced efficacy in combination with anti-VEGF.

Example 11: Treatment with anti-DLL4 antibody increased tumor endothelial cell proliferation

5 In light of the tumor growth inhibition, we used the EL4 mouse lymphoma tumor model for vascular histology studies. We found that anti-DLL4 Mab treatment resulted in a dramatic increase in endothelial cell density (Fig. 9g). In contrast, anti-VEGF had a completely opposite effect (Fig. 9g), although both treatments exhibited similar efficacy in this model.

10 **Example 12: Treatment with anti-DLL4 antibody inhibited tumor vascular perfusion**

Since *in vitro* blocking of DLL4/Notch pathway impaired the formation of lumen-like structure by ECs (Fig. 8a), it was investigated whether treatment with anti-DLL4 Mab caused similar defect in the tumor vasculature and affected efficient blood flow. Systemic perfusion with FITC-lectin revealed that anti-DLL4 Mab treatment resulted in marked reduction of lectin labeling of tumor vessels (Fig. 9h). Notably, it has been shown that arteriovenous malfunction in ALK1-deficient mice causes anomalous blood circulation (Urness, L. D. et al, *Nat Genet* 26, 328-31 (2000)). Given the critical role of DLL4/Notch signaling in AV differentiation, both in embryos and early postnatal retinas, anti-DLL4 Mab could impact cell fate specification of tumor ECs and cause defective directional blood flow. Indeed, in anti-DLL4 Mab treated Colo205 tumors, there were regions where high EC density was associated with low viable tumor cell content, implicating poor vascular function. Further studies utilizing vascular imaging techniques are needed to gain insights into the precise vascular defects.

25 **Example 13: DLL4/Notch is dispensible in homeostasis of the mouse intestine**

A major concern about global inhibition of Notch is that it may be deleterious, given the pleiotropic roles of Notch signaling in regulating the homeostasis of postnatal self-renewal systems. For instance, Notch signaling is required to maintain undifferentiated crypt progenitor cells in intestines (van Es, J. H. et al. *Nature* 435, 959-63 (2005); Fre, S. et al. *Nature* 435, 964-8 (2005)). Indeed, γ -secretase inhibitors, which would indiscriminately block all Notch activities, cause unwanted side effects in rodents due to a massive increase in goblet cells within the crypt compartment (Milano, J. et al. *Toxicol Sci* 82, 341-58 (2004); Wong, G. T. et al. *J Biol Chem* 279, 12876-82 (2004)). We examined the small intestines of mice treated with anti-DLL4 Mab by immunohistochemistry analyses. In

30

contrast to DBZ treatment, no differences in epithelial crypt cell differentiation or proliferation profiles were identified between anti-DLL4 Mab and control groups after six weeks of treatment (Fig. 10). Furthermore, anti-DLL4 Mab did not alter the expression of the Notch target gene HES-1 in the rapidly dividing transit amplifying (TA) population (Fig. 10). These results support the notion that DLL4/Notch signaling is largely restricted to the vascular system.

Example 14: Treatment with anti-DLL4 antibody does not impact adult retinal vasculature

While blocking of DLL4 had a profound impact on the retinal vascular development in neonatal mouse, administration of anti-DLL4 antibody has no visible impact on adult retinal vasculature (Fig. 8d). Thus, DLL4/Notch signaling is critical during active angiogenesis, but plays a less important role in normal vessel maintenance. In agreement with this notion, during the course of anti-DLL4 Mab treatment, no apparent weight loss or animal death was observed in tumor-bearing mice when dosed at 10 mg/kg twice per week for up to 8 weeks. In tumor models, anti-DLL4 Mab and anti-VEGF exhibit opposite effects on tumor vasculature, suggesting non-overlapping mechanisms of action.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, the descriptions and examples should not be construed as limiting the scope of the invention.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated anti-DLL4 antibody comprising:

(a) at least one, two, three, four or five hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of:

- 5 (i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 10)
- (ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is SASFLYS (SEQ ID NO:11)
- (iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQSYTGTVT
10 (SEQ ID NO:18)
- (iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1);
- (v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is GYISPNSGFTYYADSVKG (SEQ ID NO:8) and
- 15 (vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F15, wherein F1-F15 is VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); and
- (b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NOs:1-18.

20 2. An isolated anti-DLL4 antibody comprising:

(a) at least one, two, three, four or five hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of:

- (i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 10)
- 25 (ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B7, wherein B1-B7 is SASFLYS (SEQ ID NO:11)
- (iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQSYNGPST (SEQ ID NO:15)
- (iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GFTFTDNWIS
30 (SEQ ID NO:1)
- (v) HVR-H2 comprising sequence E1-E18, wherein E1-E18 is GVINPNSGATEYADSVKG (SEQ ID NO:5) and
- (vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F15, wherein F1-F15 is VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); and

(b) at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of the sequence depicted in SEQ ID NOs:1-18.

3. The antibody of claim 1 or 2, wherein a HVR-L3 variant comprises 1-6 (1, 2, 3, 4, 5, or 6) substitutions in any combination of the following positions: 91 (S or W), 92 (Y or F), 93 (T, N or S), 94 (T or G), 95 (P, Q, A or T), and/or 96 (P, S, A, or V).

4. The antibody of claim 1 or 2, wherein a HVR-H2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3, or 4) substitutions in any combination of the following positions: 50 (V, L or Y), 52 (N or S), 52a (P or S), or 53 (N, Q, T, or I).

5. An isolated anti-DLL4 antibody comprising one, two, three, four, five or six HVRs, wherein each HVR comprises, consists or consists essentially of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-18, and wherein SEQ ID NO:10 corresponds to an HVR-L1, SEQ ID NO:11 corresponds to an HVR-L2, SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 17, or 18 correspond to an HVR-L3, SEQ ID NO:1 or 2 correspond to an HVR-H1, SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 or 8 correspond to an HVR-H2, and SEQ ID NO:9 corresponds to an HVR-H3.

6. The antibody of claim 5, wherein the antibody comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 14, 2, 3, and 9.

7. The antibody of claim 5, wherein the antibody comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 15, 1, 5, and 9.

8. The antibody of claim 5, wherein the antibody comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 16, 1, 6, and 9.

9. The antibody of claim 5, wherein the antibody comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 17, 1, 7, and 9.

10. The antibody of claim 5, wherein the antibody comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO:10, 11, 18, 1, 8, and 9.

5 11. The antibody of any of claims 1-10, wherein at least a portion of the framework sequence is a human consensus framework sequence.

12. The antibody of claim 1 or 2, wherein the modification is substitution, insertion or deletion.
10

13. The antibody of any of claims 1-12, wherein the antibody comprises human κ subgroup consensus framework sequence.

14. The antibody of any of claims 1-12, wherein the antibody comprises heavy
15 chain human subgroup III consensus framework sequence.

15. The antibody of claim 14, wherein the antibody comprises a substitution at one or more of position 71, 73 or 78.

20 16. The antibody of claim 15, wherein the substitution is one or more of R71A, N73T, or N78A.

17. A polynucleotide encoding an antibody of any of claims 1-16.

25 18. A vector comprising the polynucleotide of claim 17.

19. The vector of claim 18, wherein the vector is an expression vector.

20. A host cell comprising a vector of claim 18 or 19.
30

21. The host cell of claim 20, wherein the host cell is prokaryotic.

22. The host cell of claim 20, wherein the host cell is eukaryotic.

23. The host cell of claim 20, wherein the host cell is mammalian.

24. A method for making an anti-DLL4 antibody, said method comprising (a) expressing a vector of claim 19 in a suitable host cell, and (b) recovering the antibody.

5

25. A method for making an anti-DLL4 immunoconjugate, said method comprising (a) expressing a vector of claim 19 in a suitable host cell, and (b) recovering the antibody.

10

26. The method of claim 24 or 25, wherein the host cell is prokaryotic.

27. The method of claim 24 or 25, wherein the host cell is eukaryotic.

28. A method for detection of DLL4, the method comprising detecting DLL4-anti-DLL4 antibody complex in a biological sample.

15

29. A method for diagnosing a disorder associated with DLL4 expression, the method comprising detecting DLL4-anti-DLL4 antibody complex in a biological sample from a patient having or suspected of having the disorder.

20

30. The method of any of claims 28-29, wherein the anti-DLL4 antibody is detectably labeled.

31. A composition comprising an anti-DLL4 antibody of any of claims 1-16.

25

32. A composition comprising a polynucleotide of any of claims 17-19.

33. The composition of claim 31 or 32, wherein the composition further comprises a carrier.

30

34. A method for treating a tumor, cancer, or cell proliferative disorder comprising administering an effective amount of an antibody of any of claims 1-16 to a subject in need of such treatment, whereby the tumor, cancer or cell proliferative disorder is treated.

35. The method of claim 34, wherein the tumor, cancer or cell proliferative disorder is colon cancer, lung cancer or breast cancer.

36. The method of claim 34 or 35, further comprising administering an effective
5 amount of an anti-angiogenic agent.

37. The method of claim 36, wherein the anti-angiogenic agent is an antagonist of vascular endothelial growth factor (VEGF).

10 38. The method of claim 37, wherein the VEGF antagonist is an anti-VEGF antibody.

39. The method of claim 38, wherein the anti-VEGF antibody is bevacizumab.

15 40. The method of any of claims 34-39 further comprising administering an effective amount of a chemotherapeutic agent.

41. A method of enhancing efficacy of an anti-angiogenic agent in a subject having a pathological condition associated with angiogenesis, comprising administering to the
20 subject an effective amount of an antibody of any of claims 1-16 in addition to the anti-angiogenic agent, thereby enhancing said anti-angiogenic agent's efficacy.

42. The method of claim 41, wherein the pathological condition associated with angiogenesis is a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder.

25 43. The method of claim 41, wherein the pathological condition associated with angiogenesis is an intraocular neovascular disease.

Clone #	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
152.26	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.6	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.14	G	F	S	F	R	D	N	W	I	S
152.26.20	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.34	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.40	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.82	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S

Clone #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
152.26	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.6	G	L	I	N	P	Q	S	G	S	S	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.14	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.20	G	V	I	N	P	N	S	G	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.34	G	L	I	N	P	T	S	G	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.40	G	V	I	N	S	I	S	G	A	T	A	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.82	G	Y	I	S	P	N	S	G	F	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

Clone #	H3															
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	M	101	102	
152.26	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.6	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.14	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.20	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.34	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.40	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.82	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	

Clone #	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
152.26	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.14	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.20	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.34	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.40	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
152.26.82	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

FIG. 1a

Clone #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
152.26	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.6	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.14	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.20	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.34	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.40	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.82	S	A	S	F	L	Y	S

Clone #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
152.26	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
152.26.6	Q	Q	S	Y	T	G	Q	S	T
152.26.14	Q	Q	S	V	N	G	P	A	T
152.26.20	Q	Q	S	Y	N	G	P	S	T
152.26.34	Q	Q	S	Y	T	G	P	S	T
152.26.40	Q	Q	W	F	S	T	A	P	T
152.26.82	Q	Q	S	Y	T	G	T	V	T

FIG. 1b

I					
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
II					
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
III					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Acceptor					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Second Acceptor					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	

FIG. 2a

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 19
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 20
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 21
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 22
II			
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 23
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 24
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 25
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 26
III			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 27
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 28
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 29
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 30
Acceptor			
A	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCSR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 31
B	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCSR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 32
C	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCS	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 33
Second Acceptor			
A	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 34
B	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 35
C	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 36
D	RFTISADT SKNTAYLQMN SLRAED TAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS SEQ ID NO.: 37

FIG. 2b

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

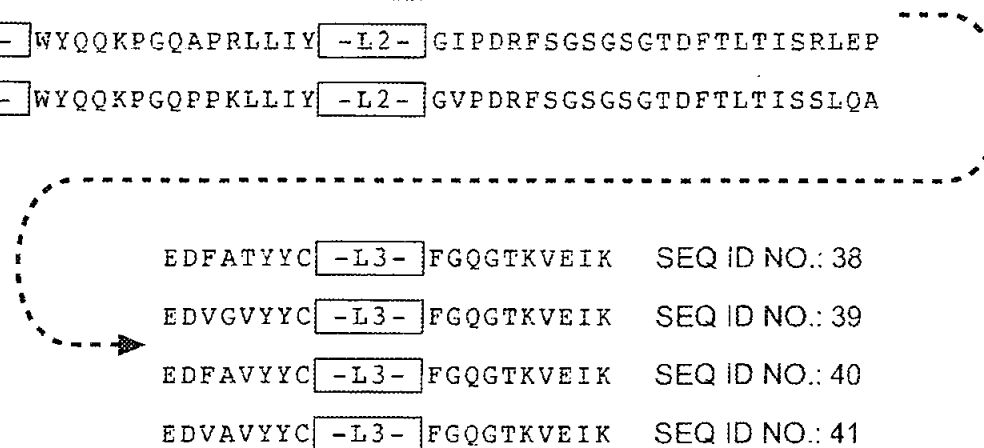


FIG. 3

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Light Chain

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Heavy Chain

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 48)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

FIG. 4**Framework Sequences of huMAb4D5-8 Light Chain Modified at Position 66 (Underlined)**

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 50)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Heavy Chain Modified at Positions 71, 73 and 78 (Underlined)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 51)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

FIG. 5

Clone 26.20

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGATEYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGLV (SEQ ID NO:54)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYNGPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:55)

Clone 26.14

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFRDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGSTDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGLV (SEQ ID NO:56)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVNGPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:57)

Clone 26.82

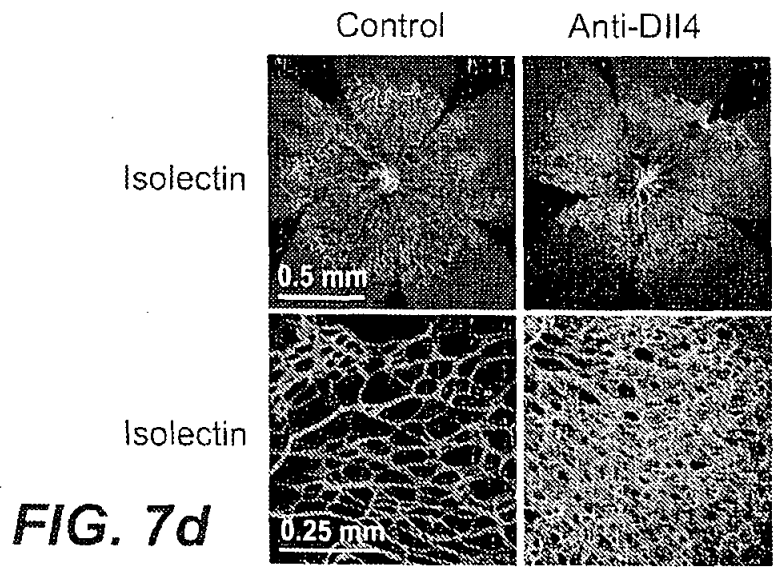
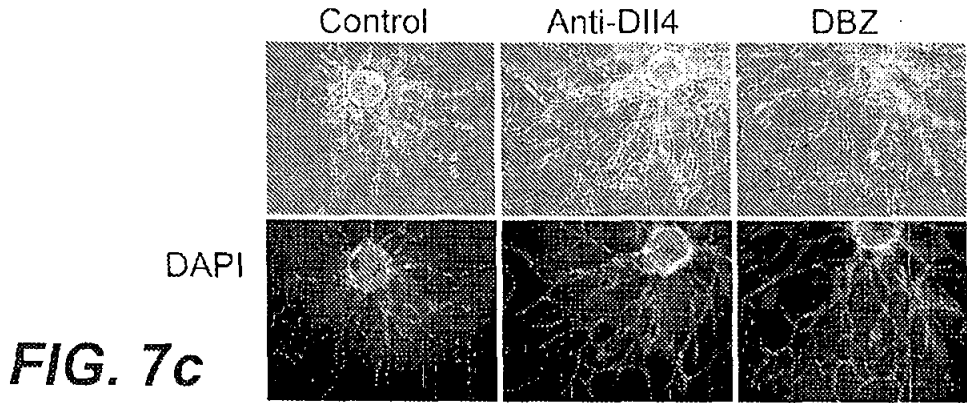
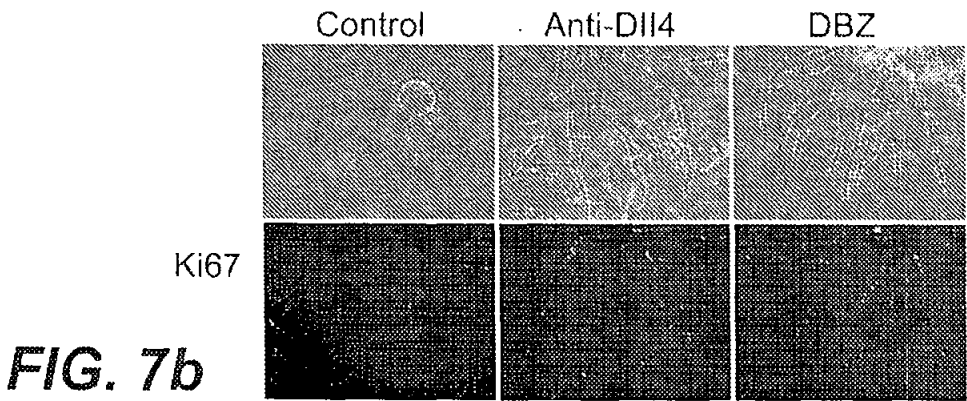
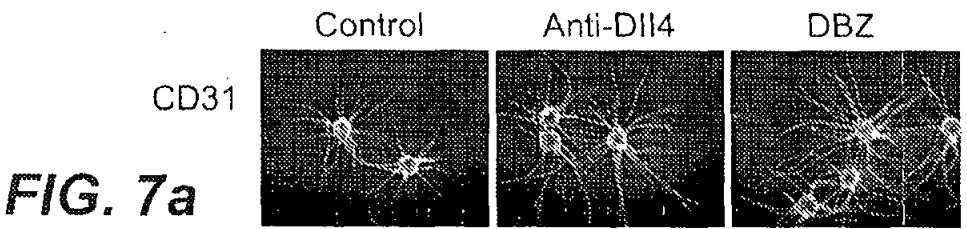
VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGLV (SEQ ID NO:58)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:59)

FIG. 6



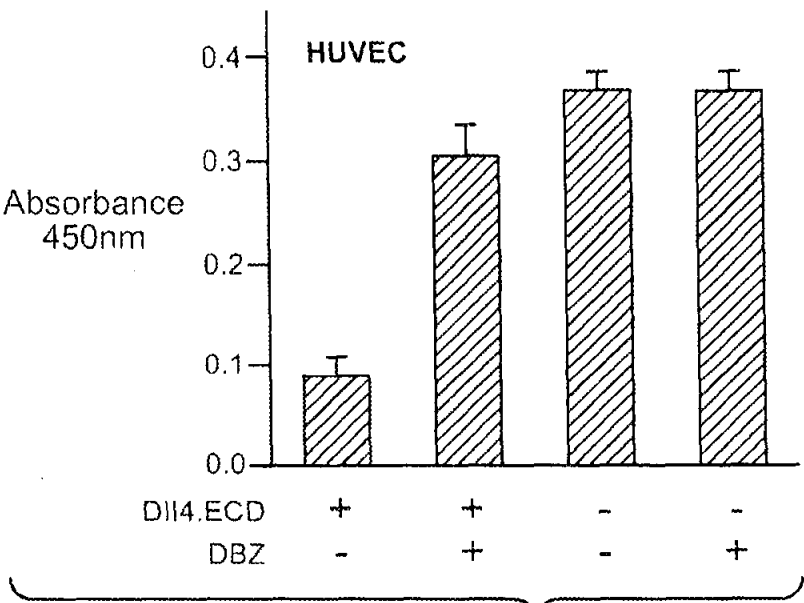


FIG. 7e

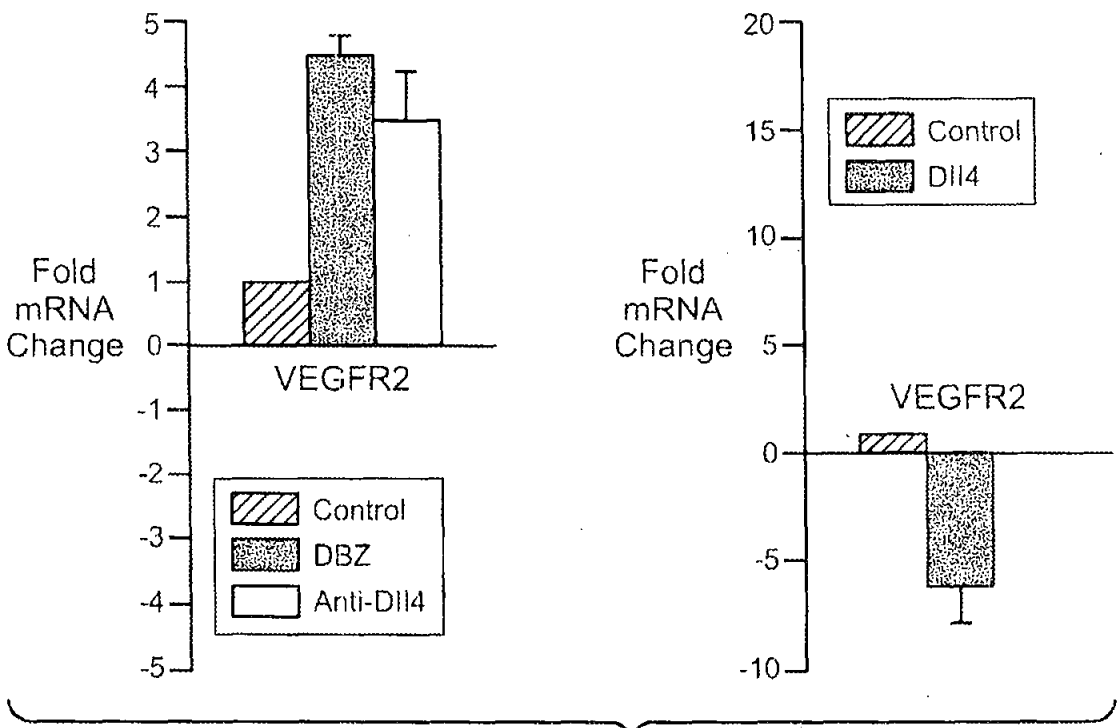


FIG. 7g

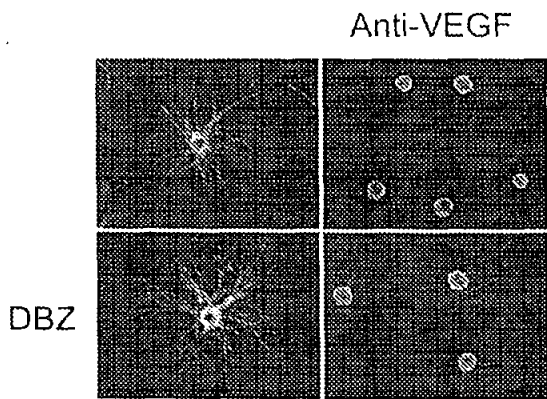


FIG. 7f

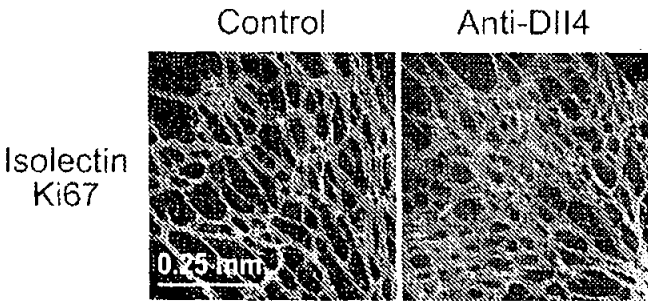


FIG. 7h

140

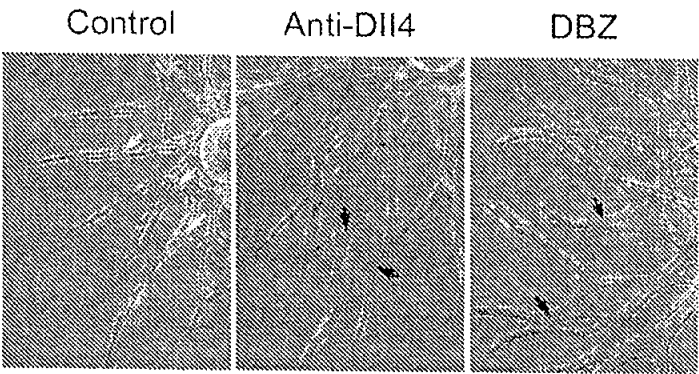


FIG. 8a

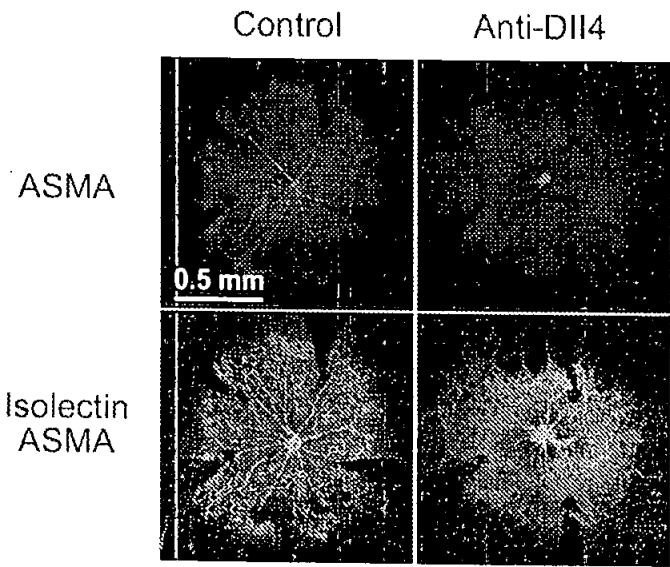


FIG. 8c

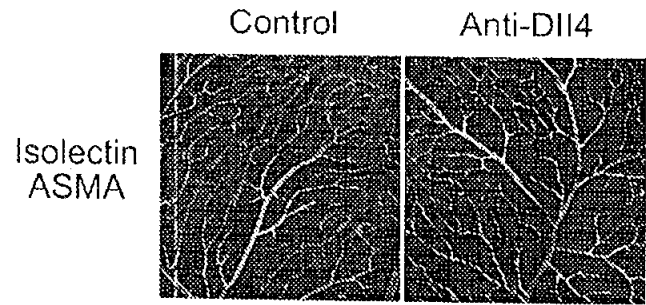


FIG. 8d

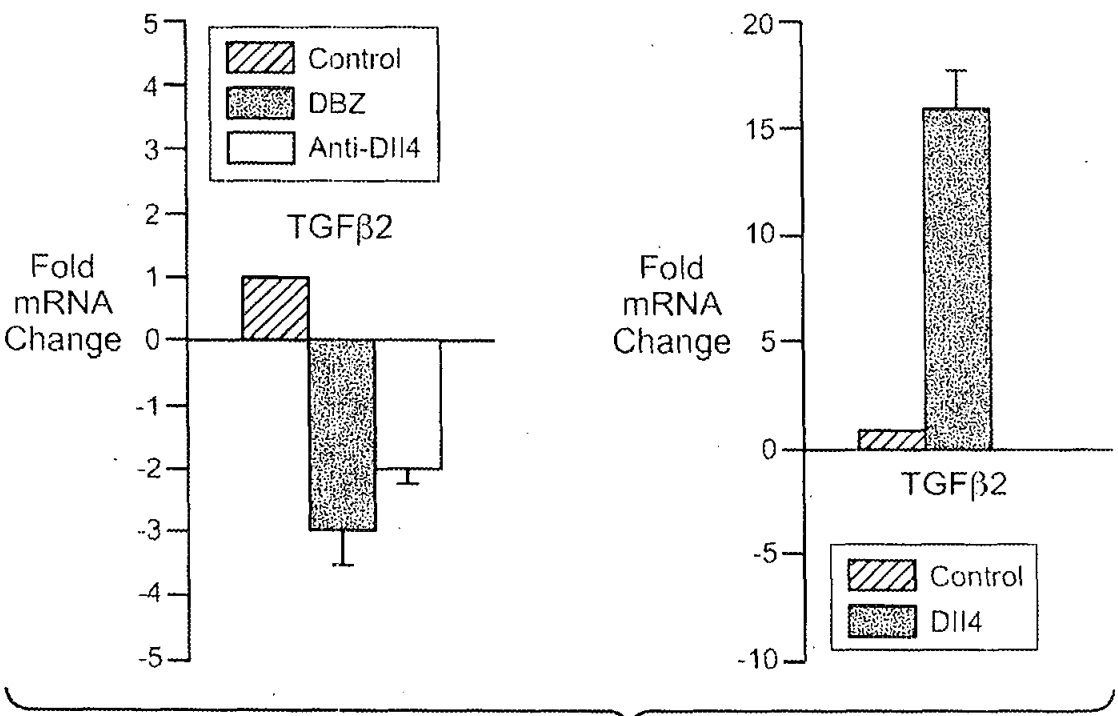
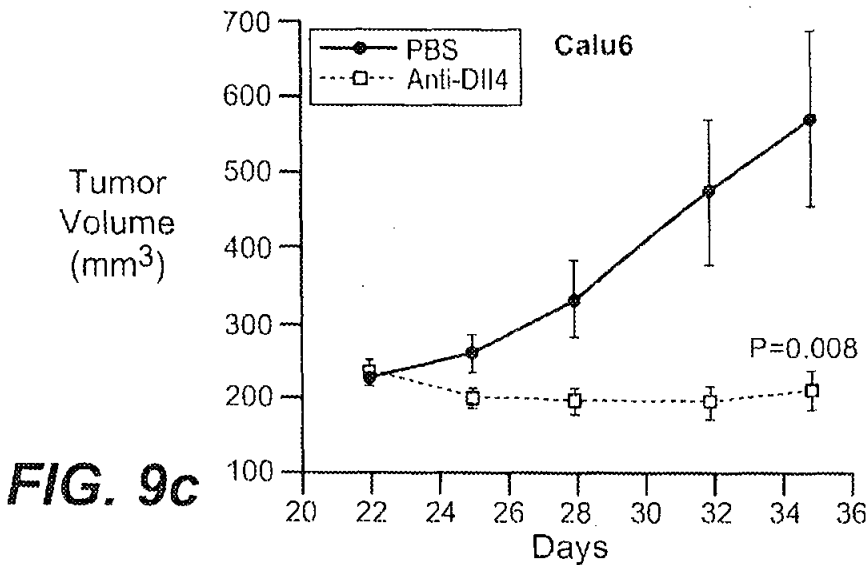
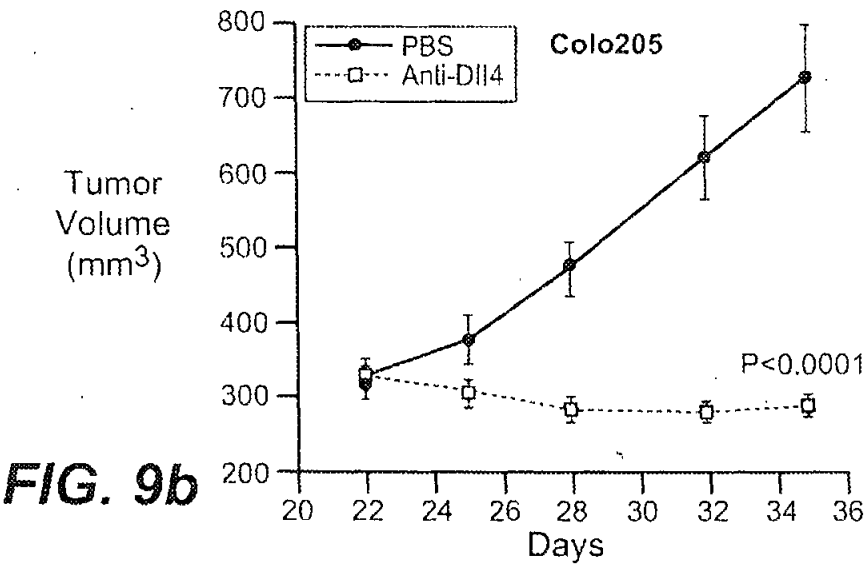
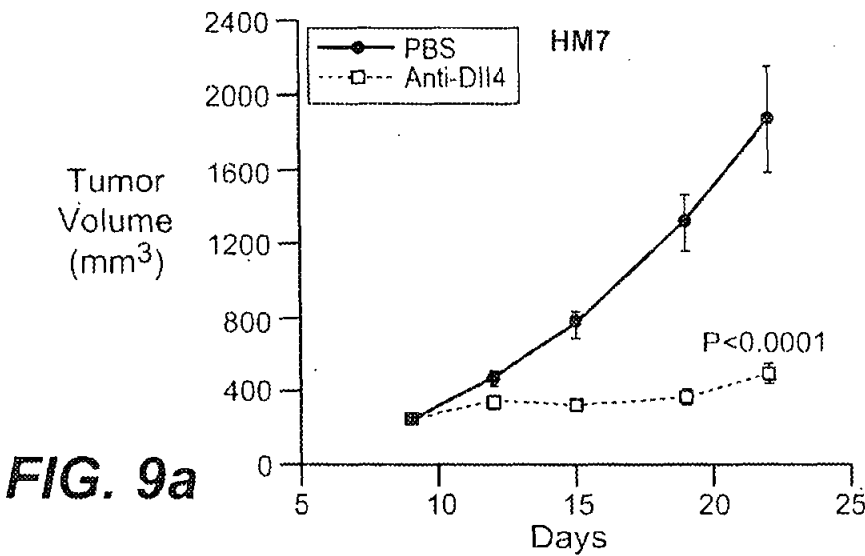
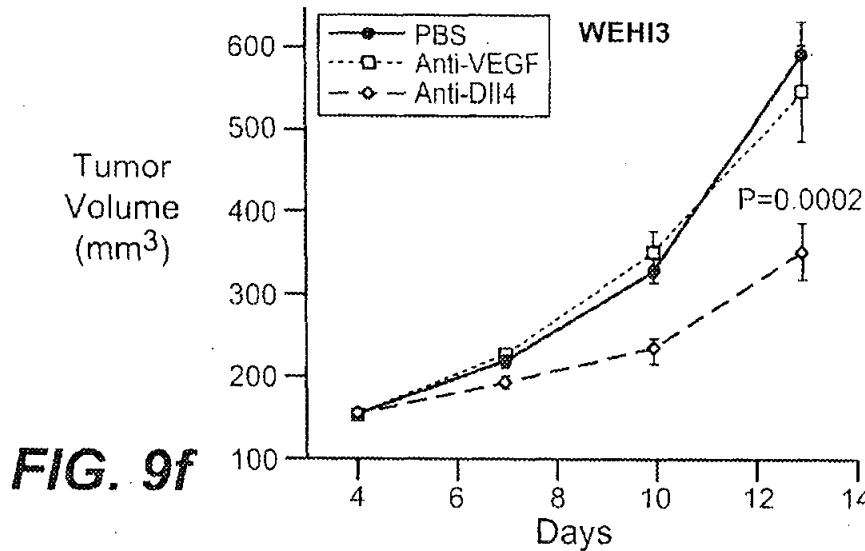
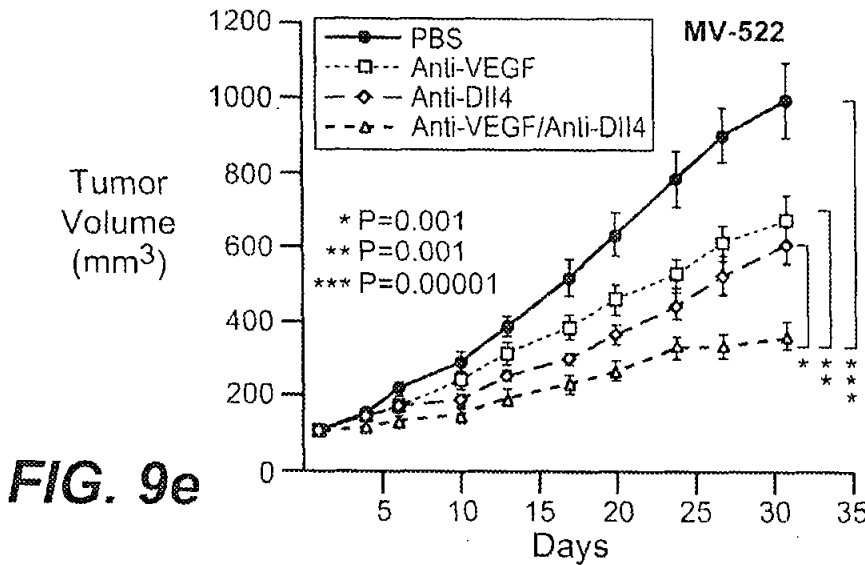
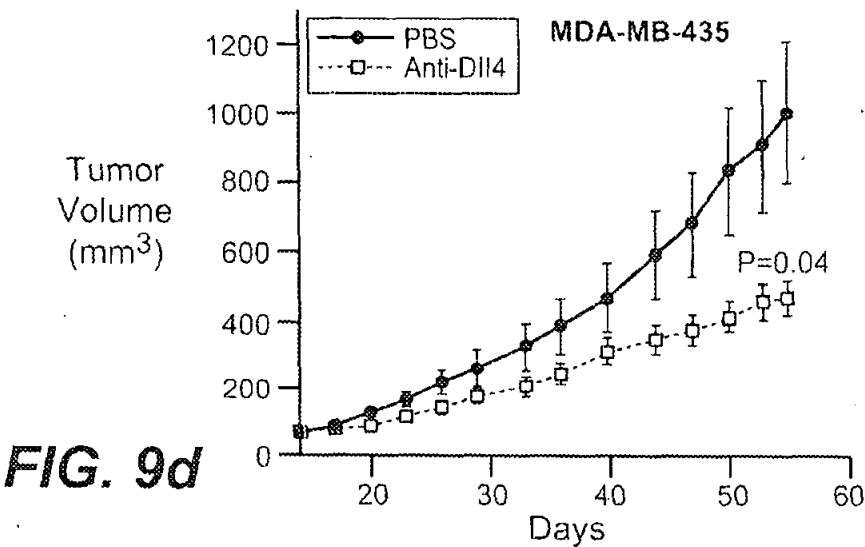


FIG. 8b





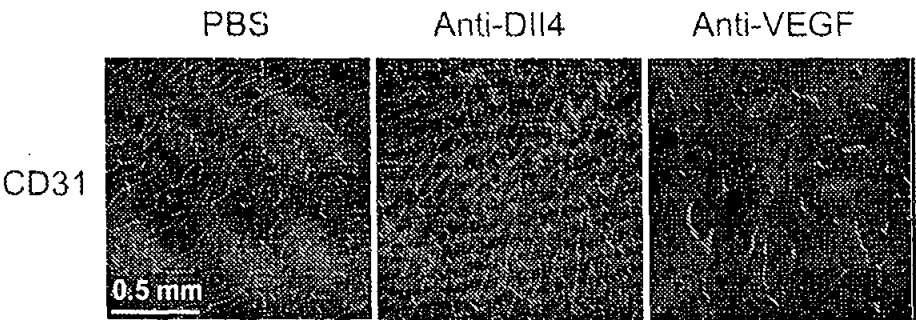


FIG. 9g

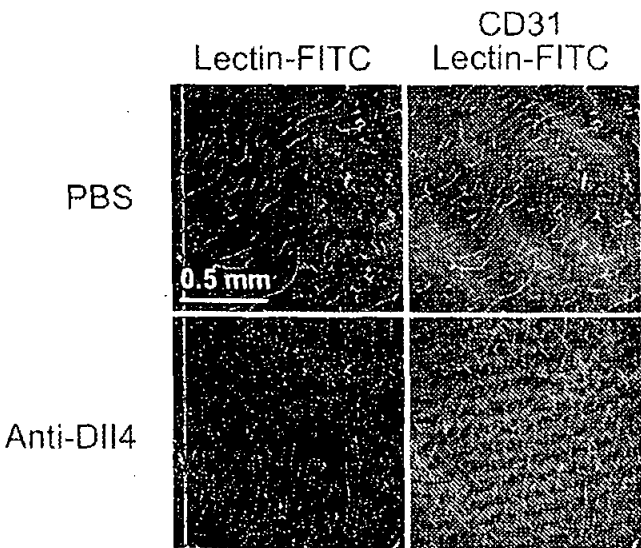
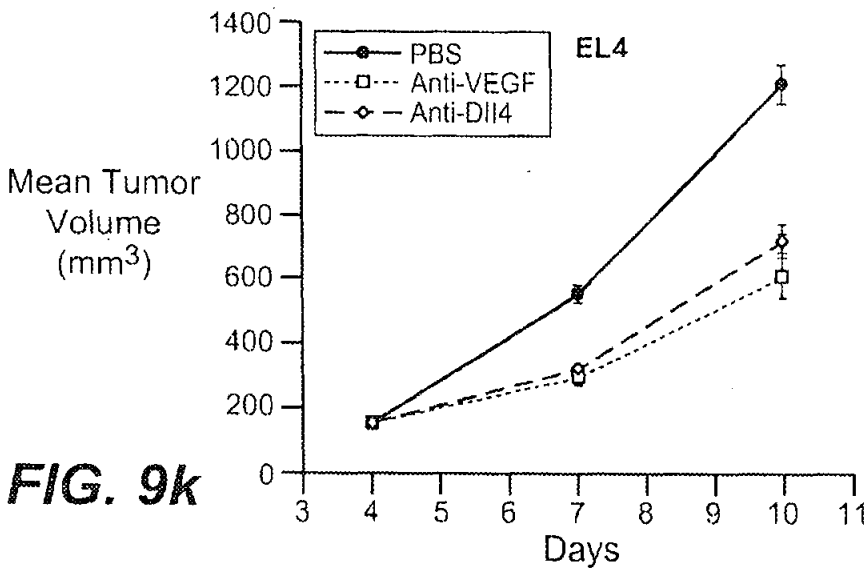
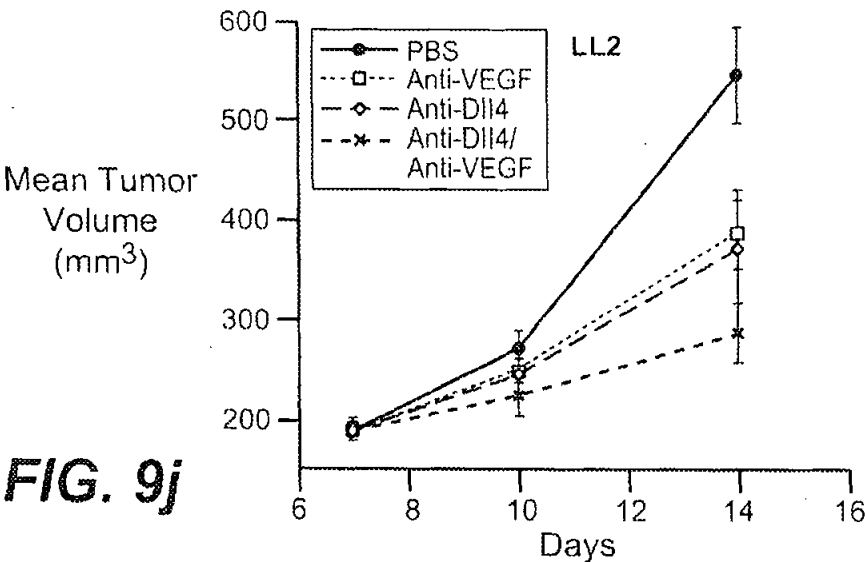
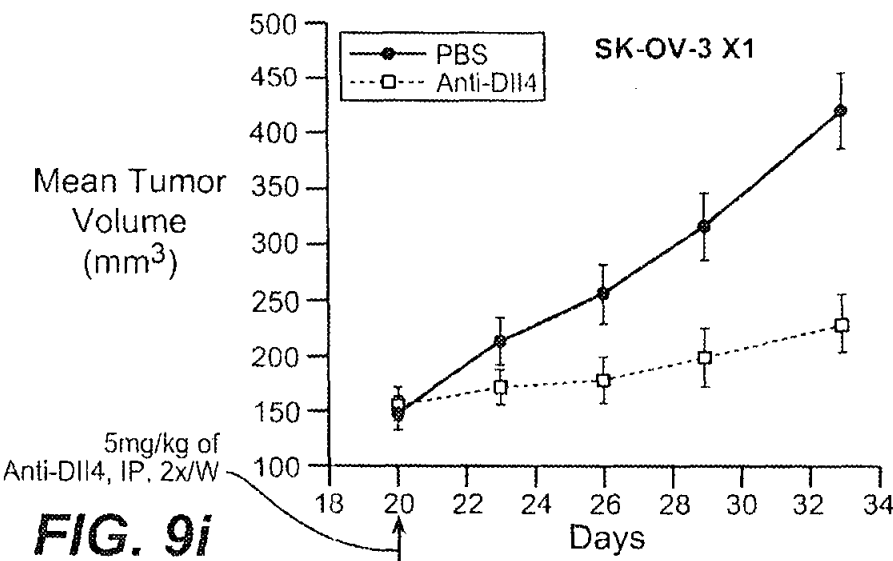


FIG. 9h



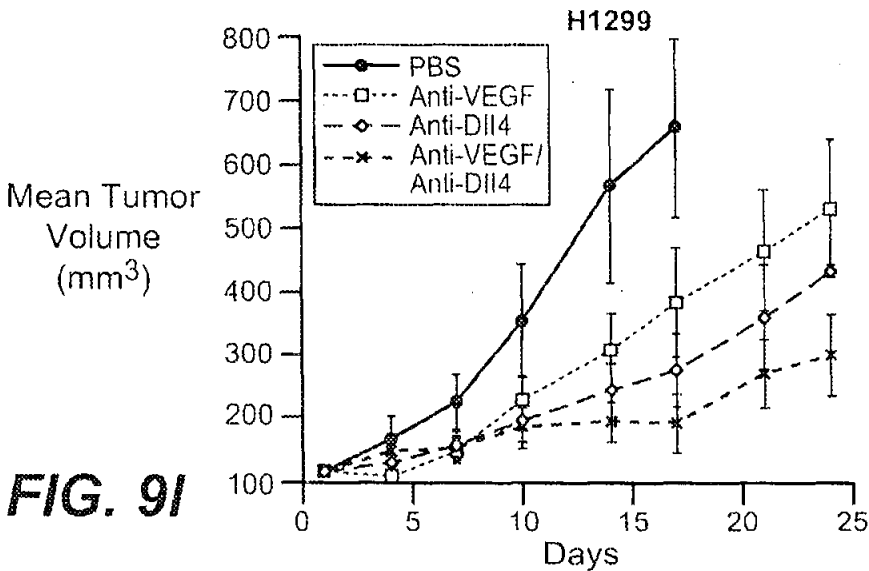


FIG. 9l

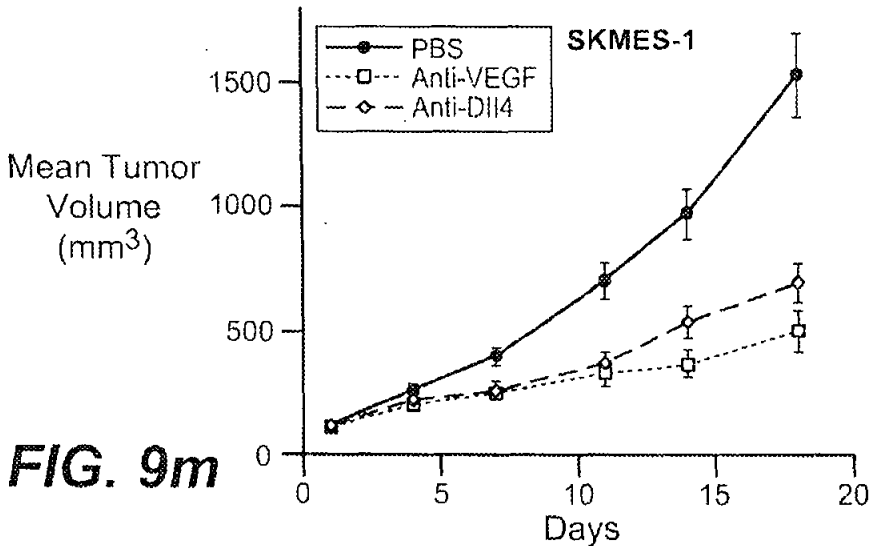


FIG. 9m

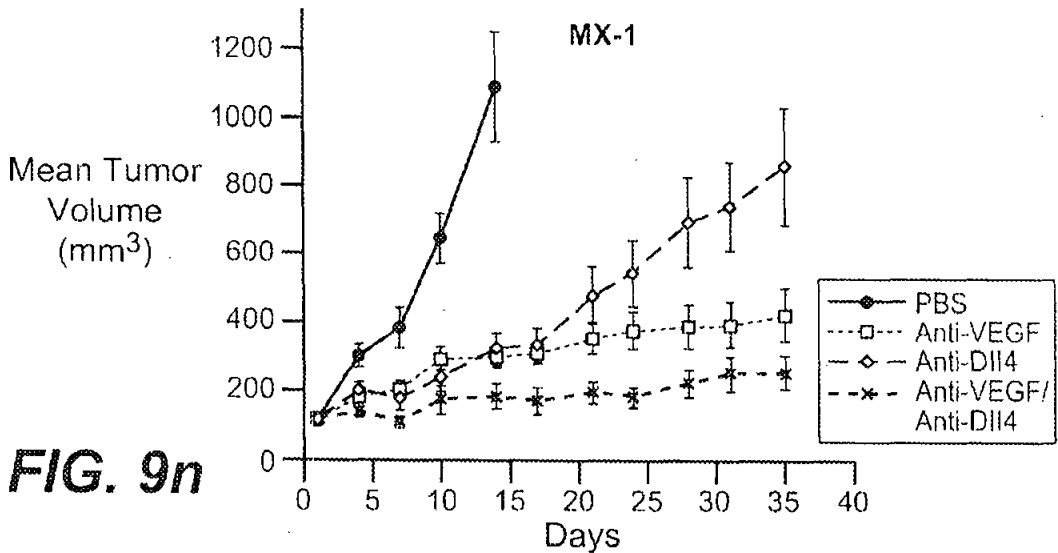
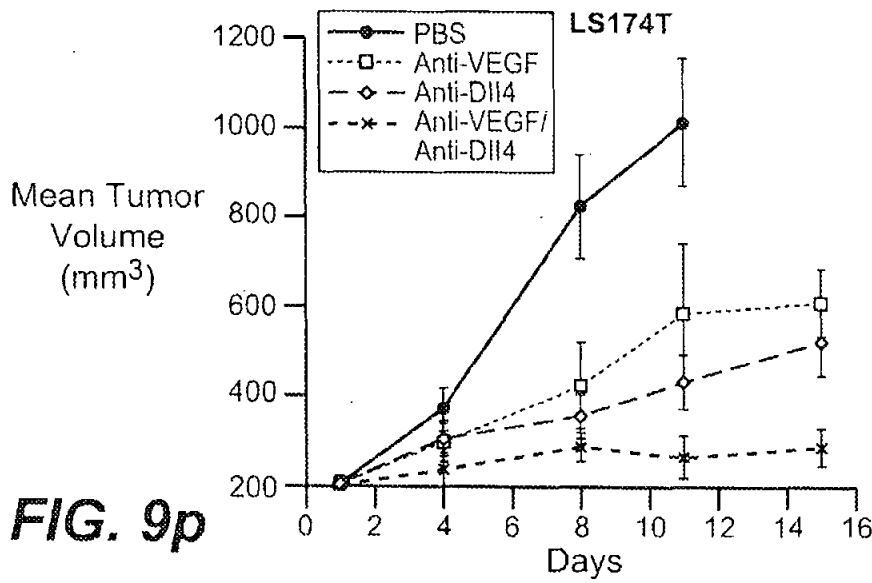
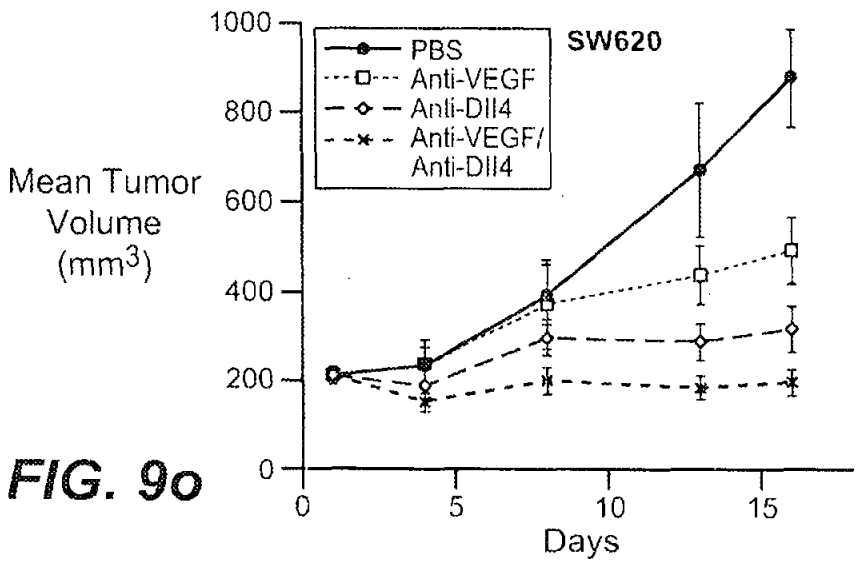


FIG. 9n



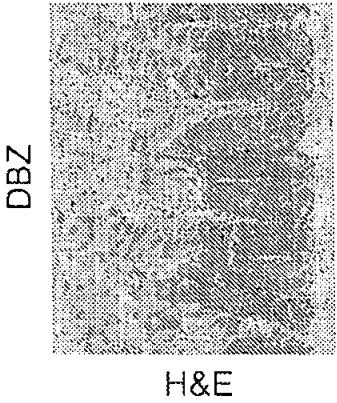


FIG. 10c

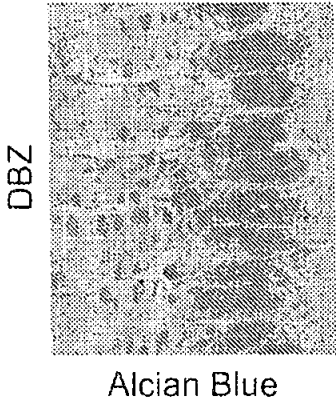


FIG. 10f



FIG. 10b

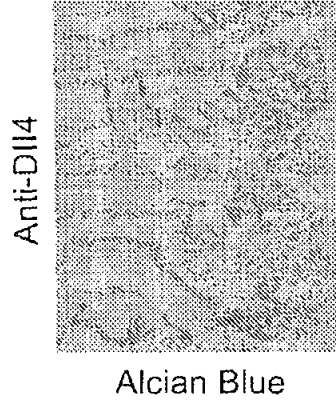


FIG. 10e

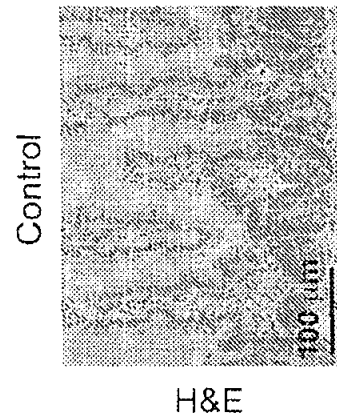


FIG. 10a

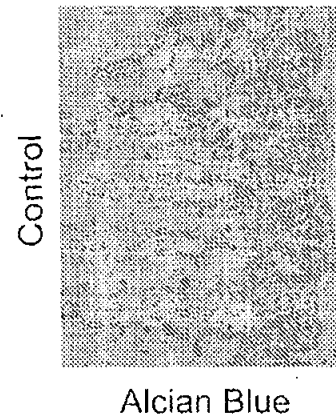


FIG. 10d

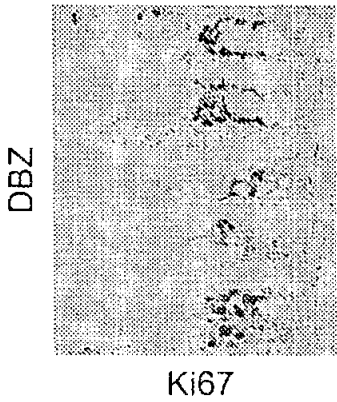


FIG. 10i

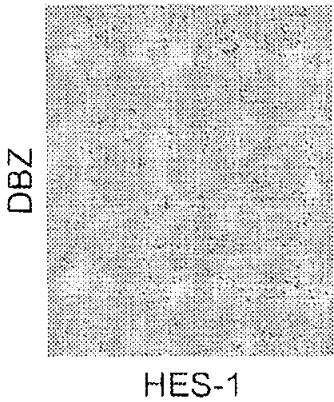


FIG. 10l

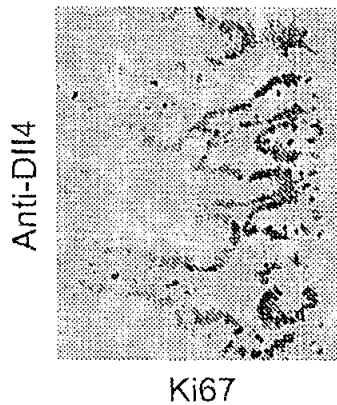


FIG. 10h

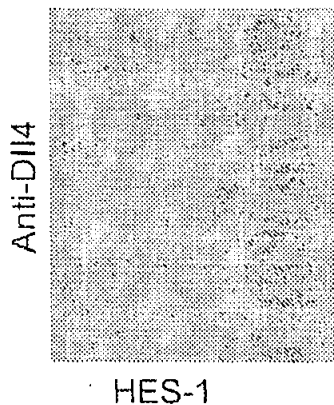


FIG. 10k

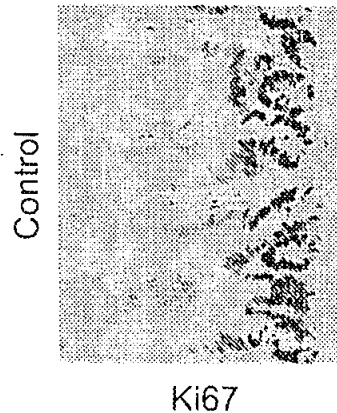


FIG. 10g

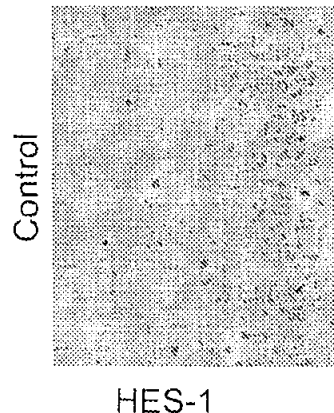


FIG. 10j

150

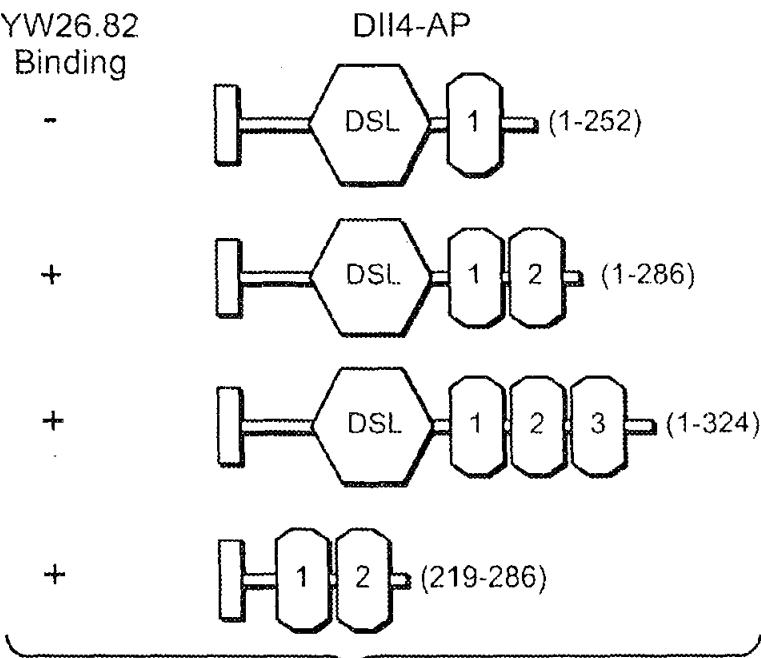


FIG. 11a

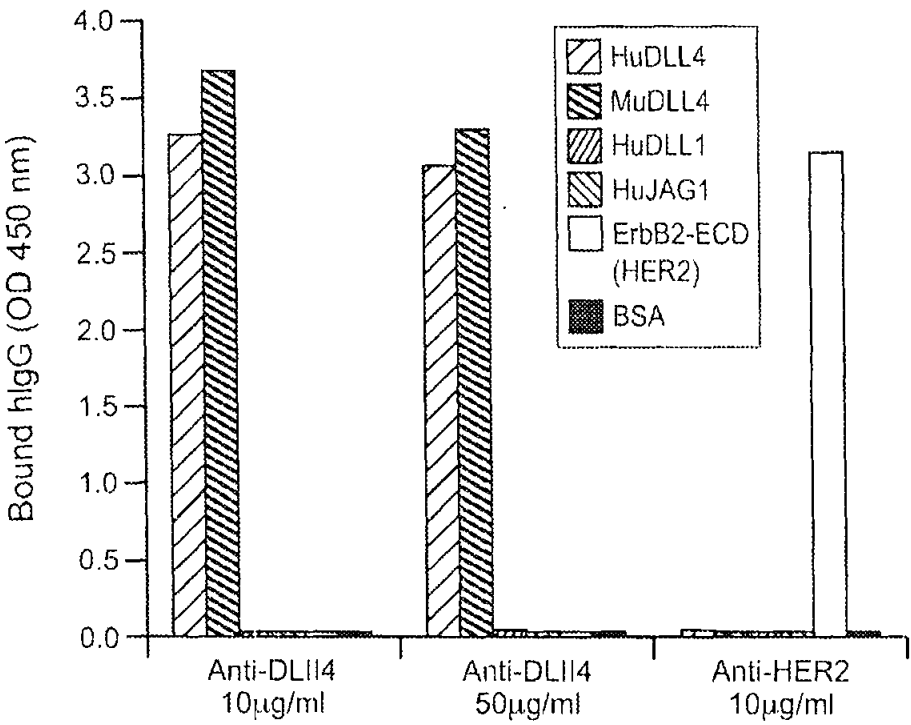


FIG. 11b

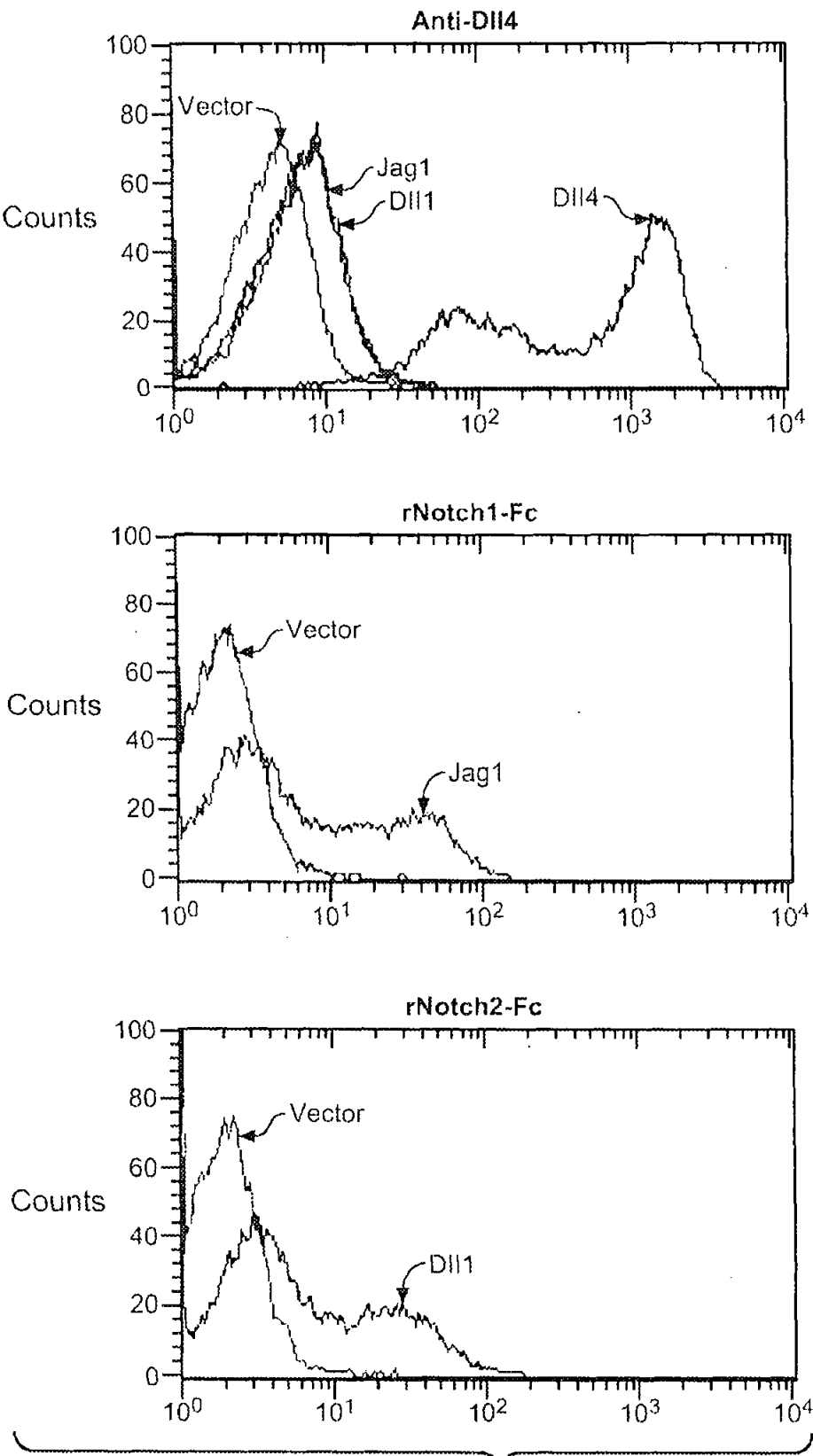


FIG. 11c

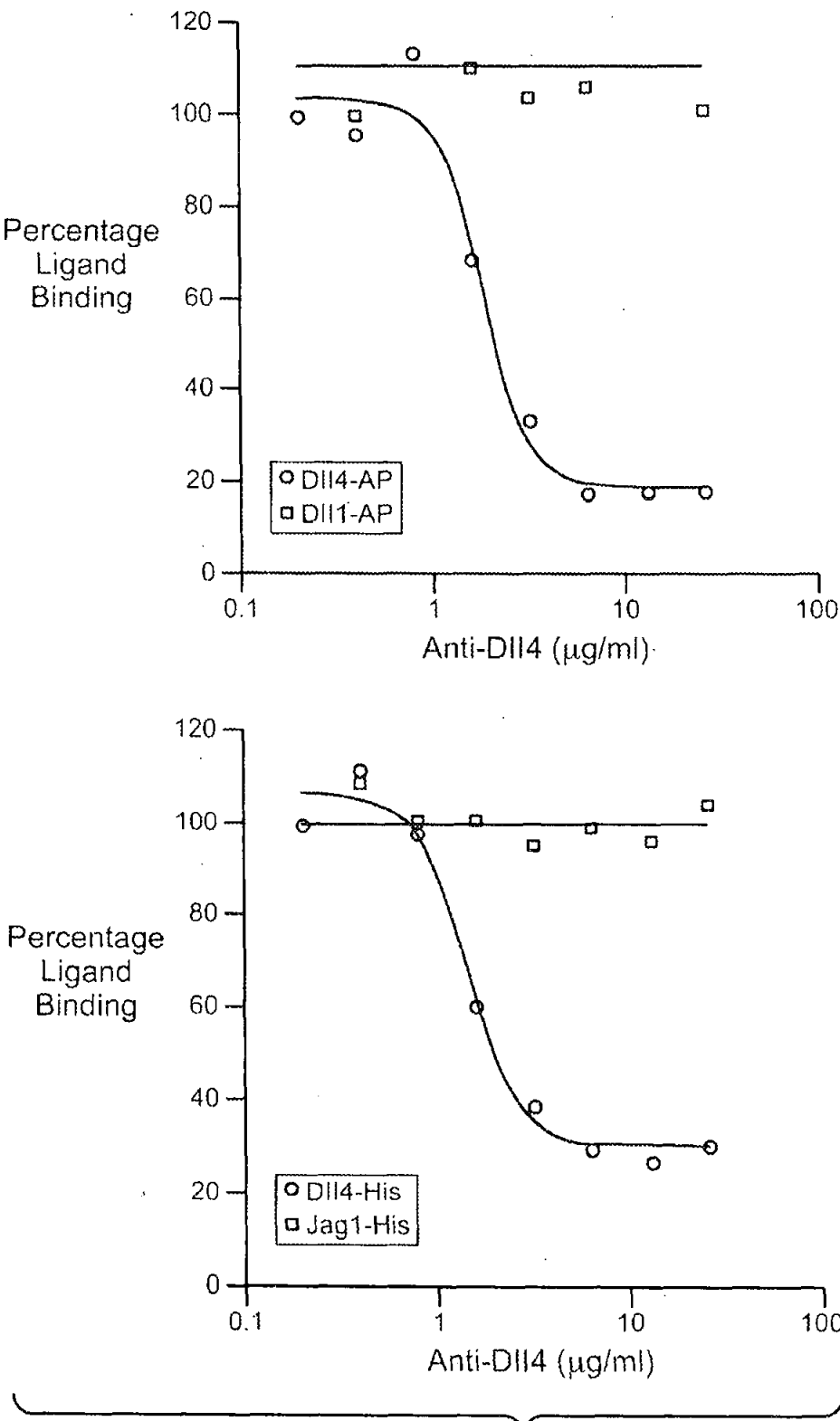


FIG. 11d

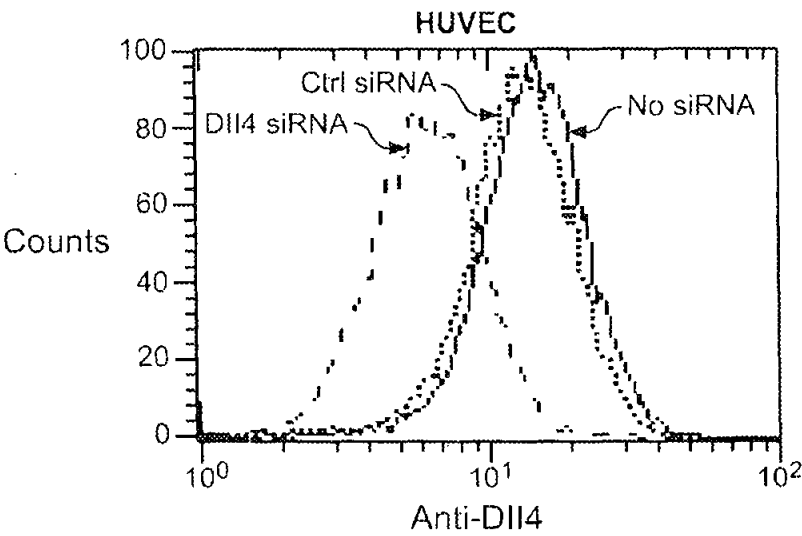


FIG. 11e

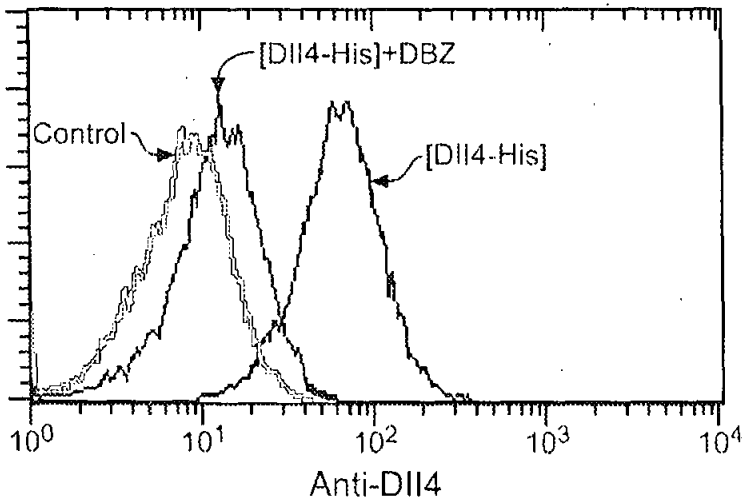


FIG. 12

GENENLAW-#246247-v1-P2336R1_-_PCT_Sequence_Listing_as_filed
Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC.
YAN, Minhong
WU, Yan

<120> ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

<130> P2336R1

<150> US 60/811,349
<151> 2006-06-06

<150> US 60/811,357
<151> 2006-06-06

<150> US 60/866,767
<151> 2006-11-21

<150> US 60/866,772
<151> 2006-11-21

<160> 78

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Trp Ile Ser
 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 2
Gly Phe Ser Phe Arg Asp Asn Trp Ile Ser
 5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 3
Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody sequence

<400> 4
 Gly Leu Ile Asn Pro Gln Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

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

<220>
 <223> antibody sequence

<400> 5
 Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Glu Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody sequence

<400> 6
 Gly Leu Ile Asn Pro Thr Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody sequence

<400> 7
 Gly Val Ile Asn Ser Ile Ser Gly Ala Thr Ala Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 8
 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 8

Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 9

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 11

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 12

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
5

<210> 13

<211> 9


```

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 13
  Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Gln Ser Thr
          5

```

```
<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
```

<220>
<223> antibody sequence

<400> 14
Gln Gln Ser Val Asn Gly Pro Ala Thr
5

```
<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
```

<220>
<223> antibody sequence

<400> 15
Gln Gln Ser Tyr Asn Gly Pro Ser Thr
5

```
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
```

<220>
<223> antibody sequence

<400> 16
Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Pro Ser Thr
5

```
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
```

<220>
<223> antibody sequence

<400> 17
Gln Gln Trp Phe Ser Thr Ala Pro Thr
5

```
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
```

<220>

<223> antibody sequence

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr
5

<210> 19

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 19

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

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

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

Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 20

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 20

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 21

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 22

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 22

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 23

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 23

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

160

GENENLAW-#246247-v1-P2336R1_-_PCT_Sequence_Listing_as_filed

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

<210> 24
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody sequence

<400> 24
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 25
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody sequence

<400> 25
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 26
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 26
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 27
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 28
<211> 81

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 29
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 30
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

<210> 31
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 32
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 33
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 34
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 35
<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 35

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 36

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 36

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 37

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 39
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15
Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 40
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 40
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 41
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 41
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 42
<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 42

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 43

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 44

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 46

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 46

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 47
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 48
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 49
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 50
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

170

GENENLAW-#246247-v1-P2336R1-_-PCT_Sequence_Listing_as_filed

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 51
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 52
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
20 25 30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 53
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys

<210> 54
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Glu Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe
95 100 105
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110

<210> 55
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Ser Tyr Asn Gly Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 56
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Arg
20 25 30
Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asp Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe
95 100 105
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110

<210> 57
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Val Asn Gly Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 58

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe
 95 100 105
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 110

<210> 59

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 59

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 60

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> CAAT_signal modified_base

<222> 2

<223> base is g, a, t or c

<400> 60

cncaat 6

<210> 61

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> PolyA_signal

<222> full

<223> polyadenylation signal

<400> 61

aataaa 6

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 62

caactgccct tatggctttt t 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 63

aaagccataa gggcagttgt t 21

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 64

caactgccct tcaatttcac t 21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 65

tgaaattgaa gggcagttgt t 21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 66

tgaccaagat ctcaactact t 21

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 67

gtagttgaga tcttggtcat t 21

<210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> siRNA

 <400> 68
 ggccaactat gcttgtgaat t 21

 <210> 69
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> siRNA

 <400> 69
 ttcacaagca tagttggcct t 21

 <210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer

 <400> 70
 aagtcttgca aatgcagcta 20

 <210> 71
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer

 <400> 71
 catcatcatt atcatcatca ttgtc 25

 <210> 72
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide probe

 <400> 72
 aattcttgga aaagtggcaa gacaaaaat 29

 <210> 73
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer

<400> 73
ctttccacca gcaggaagta g 21

<210> 74
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 74
tgcagtccga ggtccttt 18

<210> 75
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide probe

<400> 75
cgcatttgat tttcatttcg acaacaga 28

<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 76
gaagatgggtg atgggatttc 20

<210> 77
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 77
gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> oligonucleotide probe

<400> 78
caagcttccc gttctcagcc 20

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
22 de mayo de 2007 (22-05-2008)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT
WO 2007/060705 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/22 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2007/070513

(22) Fecha de Presentación Internacional:
06 de junio de 2007 (06-06-2007)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/811,349 6 de junio de 2006 (6.06.2006) EU
60/811,357 6 de junio de 2006 (6.06.2006) EU
60/866,772 21 de noviembre de 2006 (21.11.2006) EU
60/866,767 21 de noviembre de 2006 (21.11.2006) EU

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de EU): **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): **YAN, Minhong** [EU/EU]; 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404, (EU). **WU, Yan** [EU/EU]; 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404, (EU).

(74) Agente: **KALINOWSKI, Grant**; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (EU).

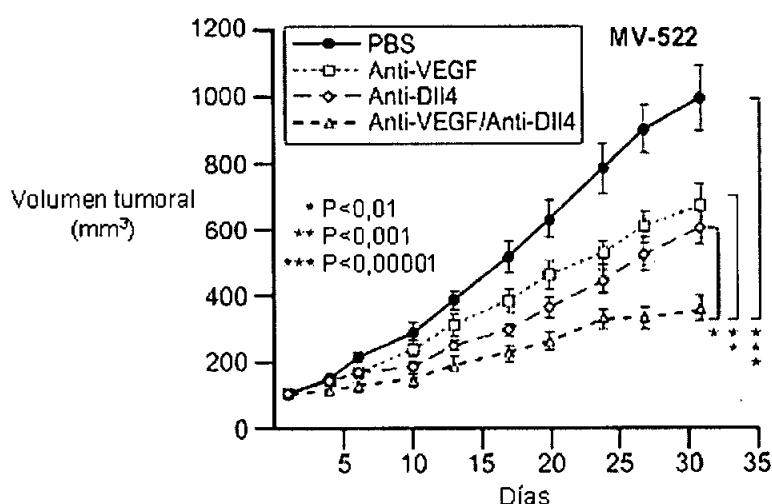
(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— sin el informe internacional de búsqueda y a ser publicada nuevamente al recibir este reporte.

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-DLL4 Y MÉTODOS QUE LOS USAN



(57) Extracto: La invención proporciona anticuerpos anti-DLL4, composiciones que comprenden estos anticuerpos y métodos de uso de los mismos.

ANTICUERPOS ANTI-DLL4 Y MÉTODOS QUE LOS USAN

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, de forma general, al campo de la biología molecular. En concreto, la invención se refiere a los anticuerpos anti-DLL4 y a sus usos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El desarrollo de un medio de aporte vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos que experimentan un crecimiento activo, como embriones y tumores, necesitan un adecuado aporte sanguíneo. Estos tejidos satisfacen esta necesidad mediante la producción de factores proangiogénicos, que fomentan la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso denominado angiogénesis. La formación de los conductos vasculares es un proceso biológico complejo pero perfectamente
15 ordenado que comprende la totalidad o gran parte de los pasos siguientes: a) las células endoteliales (CE) proliferan a partir de las células endoteliales existentes o se diferencian a partir de las células progenitoras; b) las células endoteliales migran y se fusionan para formar estructuras en forma de cordón; c) los cordones vasculares experimentan entonces el proceso de tubulogénesis para formar vasos con un lumen central; d) de los cordones o vasos existentes empiezan a salir ramificaciones para formar vasos secundarios; e) el primitivo plexo vascular
20 experimenta un nuevo remodelado; y f) las células periendoteliales son atraídas para revestir a los tubos endoteliales, cumpliendo así funciones moduladoras y de sostén de los vasos. Estas células incluyen pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para vasos de mayor tamaño y miocardiocitos en el corazón. Hanahan, *Science* 277:48-50 (1997); Hogan & Kolodziej, *Nat. Rev. Genet.* 3:513-23 (2002); Lubarsky & Krasnow, *Cell* 112:19-28 (2003).

25 Se ha demostrado ampliamente que la angiogénesis interviene en la patogénesis de diversos trastornos. Estos trastornos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares, tales como retinopatías proliferativas, como por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), glaucoma neovascular, rechazo inmunológico de tejido corneal trasplantado y de otros tejidos, artritis reumatoide y psoriasis. Folkman et al., *J. Biol. Chem.* 267:10931-34 (1992); Klagsbrun et al., *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39 (1991); y Garner A., "Vascular diseases," En: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª Edición (Marcel Dekker, NY, 1994), págs 1625-1710.
30

En el caso del crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser fundamental para la transición de la hiperplasia a la neoplasia y para proporcionar el aporte necesario para el crecimiento y la metástasis tumorales.
35 Folkman et al., *Nature* 339:58 (1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y una autonomía proliferativa frente a las células normales. Un tumor suele comenzar como una única célula anómala que puede proliferar sólo hasta alcanzar un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia desde los lechos capilares disponibles y puede permanecer "inactiva" sin crecer ni diseminarse durante un período prolongado. Algunas células tumorales cambian posteriormente al fenotipo angiogénico para

activar las células endoteliales, que proliferan y maduran hasta convertirse en vasos sanguíneos capilares nuevos. Estos vasos sanguíneos recién formados no sólo permiten el crecimiento continuo del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. Por esta razón, se ha observado una correlación entre la densidad de los microvasos en cortes de tumores y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama, así como también con otros tipos de tumores. Weidner et al., *N. Engl. J. Med.* 324:1-6 (1991); Horak et al., *Lancet* 340:1120-24 (1992); Macchiarini et al., *Lancet* 340:145-46 (1992). No se conoce bien el mecanismo exacto que controla el cambio angiogénico, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral es consecuencia del equilibrio neto de diversos estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman, *Nat. Med.* 1(1):27-31 (1995)).

El proceso de desarrollo vascular está completamente regulado. Hasta la fecha, se ha demostrado que un número significativo de moléculas, en su mayoría secretadas por factores producidos por células circundantes, regula la diferenciación, proliferación y migración de las células endoteliales y su fusión en estructuras semejantes a cordones. Por ejemplo, se ha determinado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el factor clave que interviene en la estimulación de la angiogénesis y en la inducción de la permeabilidad vascular. Ferrara et al., *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). El descubrimiento de que la pérdida de un único alelo del VEGF ocasiona letalidad embrionaria indica que este factor desempeña un papel insustituible en el desarrollo y la diferenciación del sistema vascular. Asimismo, se ha demostrado que el VEGF es un mediador clave en la neovascularización asociada a tumores y trastornos intraoculares. Ferrara et al., *Endocr. Rev. supra.* El ARNm del VEGF está sobreexpresado en la mayoría de los tumores examinados en humanos. Berkman et al., *J. Clin. Invest.* 91:153-59 (1993); Brown et al., *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al., *Cancer Res.* 53:4727-35 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer* 73:931-34 (1996); Dvorak et al., *Am. J. Pathol.* 146:1029-39 (1995).

Asimismo, existe una gran correlación entre los niveles de concentración del VEGF en los líquidos oculares y la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatía diabética y otras retinopatías asociadas a isquemia. Aiello et al., *N. Engl. J. Med.* 331:1480-87 (1994). Además, diversos estudios han indicado la localización del VEGF en membranas neovasculares coroideas en pacientes con DMAE. Lopez et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-68 (1996).

Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF inhiben el crecimiento de diversas líneas de células tumorales humanas en ratones atímicos desnudos (Kim et al., *Nature* 362:841-44 (1993); Warren et al., *J. Clin. Invest.* 95:1789-97 (1995); Borgström et al., *Cancer Res.* 56:4032-39 (1996); Melnyk et al., *Cancer Res.* 56:921-24 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos con trastornos retinianos isquémicos (Adamis et al., *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción del VEGF son prometedores candidatos para el tratamiento de tumores y de diversos trastornos neovasculares intraoculares. Estos anticuerpos se describen, por ejemplo, en la patente europea EP.817.648, publicada el 14 de enero de 1998, y en los documentos WO 98/45331 y WO 98/45332, ambos publicados el 15 de octubre de 1998. Un anticuerpo anti-VEGF, bevacizumab, ha sido aprobado por la FDA para su uso en combinación con quimioterapia para tratar neoplasias malignas concretas y un fragmento de un anticuerpo anti-VEGF, ranibizumab, ha sido aprobado por la FDA para tratar la degeneración macular (de tipo húmedo) asociada a la edad. Los dos fármacos se están estudiando en ensayos clínicos actualmente en curso.

Es evidente que sigue existiendo la necesidad de disponer de agentes que presenten características clínicas óptimas para su desarrollo como fármacos. La invención explicada en la presente memoria descriptiva satisface esta necesidad y ofrece otros beneficios.

5 Todas las referencias citadas en la misma, incluidas las solicitudes de patentes y publicaciones, quedan incorporadas en su totalidad a modo de referencia.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se basa en parte en la identificación de diversos agentes de unión a DLL4 (como immunoconjugados, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos). La DLL4 se presenta como una diana terapéutica importante y ventajosa y la invención ofrece composiciones y métodos basados en la unión a DLL4. Los agentes de unión a DLL4 de la invención, descritos en la presente memoria descriptiva, proporcionan importantes agentes diagnósticos y terapéuticos para actuar sobre procesos patológicos asociados a la expresión y/o actividad de las vías del receptor DLL4/Notch. Según esto, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación asociados a la unión a DLL4.

15 La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a DLL4 (como los que se unen específicamente).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado anti-DLL4, en el que una forma IgG de longitud completa del anticuerpo se une específicamente a la DLL4 humana con una afinidad de unión de 1 nM aproximadamente o superior; es decir, de 500 pM aproximadamente o superior. Como es bien sabido en este campo, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando uno de los diversos ensayos existentes y se puede expresar en función de diversos valores cuantitativos. Por ello, en una forma de realización, la afinidad de unión se expresa como valores K_d y refleja una afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). Por lo general y preferiblemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, ya sea en un entorno sin células o asociado a células. Se puede utilizar cualquiera de los diversos ensayos conocidos en este campo, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva, para obtener mediciones de la afinidad de unión, incluidos, por ejemplo, Biacore®, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA. En algunas formas de realización, el anticuerpo aislado anti-DLL4 se une tanto a DLL4 humana como murina con una afinidad similar; es decir, la afinidad de unión por la DLL4 humana no es superior a 100 veces, más o menos, la afinidad de unión por la DLL4 murina. En algunas formas de realización, la afinidad de unión por la DLL4 humana no es superior a 10 veces, más o menos, la afinidad de unión por la DLL4 murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a la DLL4 murina con una afinidad de unión de 1 nM aproximadamente o superior; es decir, de 500 pM aproximadamente o superior.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado anti-DLL4, en el que una forma IgG de longitud completa del anticuerpo se une específicamente a la DLL4 humana con una k_{on} de 2×10^5 o superior, o de 1×10^5 o superior. Como es bien sabido en este campo, la k_{on} de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando uno de los diversos ensayos existentes y se puede expresar en función de diversos valores cuantitativos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a una región de DLL4 de unión a ligando. En algunas formas de realización, el anticuerpo aislado se une a un polipéptido que comprende el dominio extracelular DLL4, está formado por él o lo contiene esencialmente. En algunas formas de realización, el anticuerpo aislado se une a un polipéptido que comprende los aminoácidos 252-282, 1-252, 1-286, 1-324 y/o 219-286 de DLL4 humana, está formado por ellos o los contiene esencialmente.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado anti-DLL4 que compite con el receptor de Notch por la unión de DLL4.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado anti-DLL4 que inhibe, reduce y/o bloquea la actividad biológica de DLL4.

En un aspecto, un anticuerpo anti-DLL4 de la invención comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de la región hipervariable (HVR) seleccionadas en el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, donde A1-A11 es RASQDVSTAVA (identificador de secuencia n.º: 10)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es SASFLYS (identificador de secuencia n.º: 11)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQSYNGPST (identificador de secuencia n.º: 15)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GFTFTDNWIS (identificador de secuencia n.º: 1)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GVINPNSGATEYADSVKG (identificador de secuencia n.º: 5) y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F15, donde F1-F15 es VYYCARDNFGGYFDY (identificador de secuencia n.º: 9); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la secuencia de la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia núms: 1-18.

En un aspecto, un anticuerpo anti-DLL4 de la invención comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de la región hipervariable (HVR) seleccionadas en el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, donde A1-A11 es RASQDVSTAVA (identificador de secuencia n.º: 10)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es SASFLYS (identificador de secuencia n.º: 11)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQSVNGPAT (identificador de secuencia n.º: 14)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GFSFRDNWIS (identificador de secuencia n.º: 2);

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GVINPNSGSTDYADSVKG (identificador de secuencia n.º: 3);

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F15, donde F1-F15 es VYYCARDNFGGYFDY (identificador de secuencia n.º: 9); y

5 (b) al menos una variante de la HVR, donde la secuencia de la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia núms: 1-18.

En un aspecto, un anticuerpo anti-DLL4 de la invención comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de la región hipervariable (HVR) seleccionadas en el grupo formado por:

10 (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, donde A1-A11 es RASQDVSTAVA (identificador de secuencia n.º: 10)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es SASFLYS (identificador de secuencia n.º: 11)

15 (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQSYTGTVT (identificador de secuencia n.º: 18)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GFTFTDNWIS (identificador de secuencia n.º: 1);

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GYISPNSGFTYYADSVKG (identificador de secuencia n.º: 8) y

20 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F15, donde F1-F15 es VYYCARDNFGGYFDY (identificador de secuencia n.º: 9); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la secuencia de la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia núms: 1-18.

25 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR, donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada entre el grupo formado por los identificadores de secuencia núms: 1-18, y donde el identificador de secuencia n.º: 10 se corresponde con una HVR-L1; el identificador de secuencia n.º: 11 se corresponde con una HVR-L2; los identificadores de secuencia n.º 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 se corresponden con una HVR-L3; los identificadores de secuencia n.º 1 ó 2 se corresponden con una HVR-H1; los identificadores de secuencia n.º 3, 4, 5, 6, 7 u 8 se corresponden con una HVR-
30 H2; y el identificador de secuencia n.º 9 se corresponde con una HVR-H3. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia núms: 10, 11, 12, 1, 3, 9.

35 En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia núms: 10, 11, 13, 1, 4, 9. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia núms: 10, 11, 14, 2, 3, 9. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de

secuencia núms: 10, 11, 15, 1, 5, 9. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia núms: 10, 11, 16, 1, 6, 9. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia núms: 10, 11, 17, 1, 7, 9. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia núms: 10, 11, 18, 1, 8, 9.

Las variantes de las HVR en un anticuerpo de la invención pueden tener modificaciones en uno o más residuos (como dos, tres, cuatro, cinco o más) dentro de la HVR.

En una forma de realización, una variante de la HVR-L3 comprende 1-6 (1, 2, 3, 4, 5 ó 6) sustituciones en cualquier combinación de las posiciones siguientes: 91 (S o W), 92 (Y o F), 93 (T, N o S), 94 (T o G), 95 (P, Q, A o T), y/o 96 (P, S, A o V).

En una forma de realización, una variante de la HVR-H2 comprende de 1 a 4 (1, 2, 3 ó 4) sustituciones en cualquier combinación de las posiciones siguientes: 50 (V, L o Y), 52 (N o S), 52a (P o S) o 53 (N, Q, T o I).

La letra o letras entre paréntesis que siguen a cada posición indican un aminoácido utilizado como sustitución (es decir, reemplazo) a modo de ejemplo; como los expertos en la materia saben, la idoneidad de otros aminoácidos para su uso como aminoácidos de sustitución en el contexto expuesto en la presente memoria descriptiva se puede evaluar empleando técnicas conocidas en la materia o descritas en esta memoria.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º: 1 ó 2. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H2 que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º: 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H3 que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º: 9. En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-L1 que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º: 10. En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-L2 que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º: 11. En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-L3 que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º: 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres siguientes:

- (i) una secuencia HVR-H1 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 1;
- (ii) una secuencia HVR-H2 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 5;
- (iii) una secuencia HVR-H3 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 9.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres siguientes:

- (i) una secuencia HVR-L1 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 10;
- (ii) una secuencia HVR-L2 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 11;
- (iii) una secuencia HVR-L3 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres siguientes:

- (i) una secuencia HVR-H1 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 1;
- (ii) una secuencia HVR-H2 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 8;
- (iii) una secuencia HVR-H3 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 9.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres siguientes:

- (i) una secuencia HVR-L1 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 10;
- (ii) una secuencia HVR-L2 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 11;
- (iii) una secuencia HVR-L3 que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 18.

Las secuencias aminoácidas de los identificadores de secuencia núms 1-18 están numeradas con respecto a HVR individuales (es decir, H1, H2 o H3), como se indica en las Figuras 1a y 1b, y la numeración corresponde al sistema de numeración de Kabat descrito más adelante.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencias de la HVR de la cadena pesada, como se muestra en las Figuras 1a y 1b.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencias de la HVR de la cadena ligera, como se muestra en las Figuras 1a y 1b.

Algunas formas de realización de anticuerpos de la invención comprenden un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU) (al que también se hace referencia en la Patente de EE.UU. n.º 6.407.213 y en Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93) como se muestra en el identificador de secuencia n.º: 52 más adelante.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (identificador de secuencia n.º: 52) (los residuos de la HVR aparecen
subrayados)

En una forma de realización, la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8 se modifica en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His, como se ha indicado en negrita/cursiva antes, respectivamente). En una forma de realización, la secuencia modificada de huMAb4D5-8 comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. Por lo tanto, en una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia mostrada en el identificador de secuencia n.º: 53 a continuación:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (identificador de secuencia n.º: 53) (los residuos de la HVR aparecen
subrayados)

Los residuos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 aparecen en negrita/cursiva anteriormente.

5 Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia de estructura del dominio variable apropiada, siempre que la actividad de unión a DLL4 se conserve en su mayor parte. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia de consenso de la estructura de la cadena pesada del subgrupo III humano. En una forma de realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de la estructura comprende sustitución en las posiciones 71, 73 y/o 78. En algunas formas de realización de estos anticuerpos, la posición 71 es A, la 73 es T y/o la 78 es A. En una forma de realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de estructuras de dominio variable de la cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU.) (también mencionada en las Patentes de EE.UU. núms. 6.407.213 y 5.821.337 y Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93). En una forma de realización, estos anticuerpos comprenden, además, una secuencia de consenso de la estructura de la cadena ligera κ I humana. En una forma de realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias de la HVR de la cadena ligera de huMAb4D5-8, como se describe en las Patentes de EE.UU. núms. 6.407.213 y 5.821.337). En una forma de realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU.) (también mencionados en las Patentes de EE.UU. núms. 6.407.213 y 5.821.337 y en Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93).

20 En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y/o 37, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 se corresponden con los identificadores de secuencia núms.: 1, 5 y/o 9, respectivamente. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 38, 39, 40 y/o 41, y las secuencias de la HVR L1, L2 y L3 son los identificadores de secuencia núms: 10, 11 y/o 15, respectivamente.

25 En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y/o 37, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 se corresponden con los identificadores de secuencia núms.: 2, 3 y/o 9, respectivamente. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 38, 39, 40 y/o 41, y las secuencias de la HVR L1, L2 y L3 son los identificadores de secuencia núms: 10, 11 y/o 14, respectivamente.

30 En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y/o 37, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 se corresponden con los identificadores de secuencia núms.: 1, 8 y/o 9, respectivamente. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de estructura

comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 38, 39, 40 y/o 41, y las secuencias de la HVR L1, L2 y L3 son los identificadores de secuencia núms: 10, 11 y/o 18, respectivamente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 46, 47, 48 y/o 49, y las secuencias de la HVR H1, H2 y H3 corresponden a los identificadores de secuencia núms: 1, 5 y/o 9, respectivamente. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 42, 43, 44 y/o 45, y las secuencias de la HVR L1, L2 y L3 son los identificadores de secuencia núms: 10, 11 y/o 15, respectivamente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 46, 47, 48 y/o 49, y las secuencias de la HVR H1, H2 y H3 corresponden a los identificadores de secuencia núms: 2, 3 y/o 9, respectivamente. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 42, 43, 44 y/o 45, y las secuencias de la HVR L1, L2 y L3 son los identificadores de secuencia núms: 10, 11 y/o 14, respectivamente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 46, 47, 48 y/o 49, y las secuencias de la HVR H1, H2 y H3 corresponden a los identificadores de secuencia núms: 1, 8 y/o 9, respectivamente. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de estructura comprende la secuencia de los identificadores de secuencia núms: 42, 43, 44 y/o 45, y las secuencias de la HVR L1, L2 y L3 son los identificadores de secuencia núms: 10, 11 y/o 18, respectivamente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención tiene maduración de afinidad para obtener la afinidad de unión a la diana deseada. En un ejemplo, un anticuerpo de la invención con maduración de afinidad comprende sustitución en una o más de las posiciones aminoácidas H28, H30, H31, H32, H33, L91, L92, L93, L94, L95 y/o L96. En un ejemplo, un anticuerpo de la invención con maduración de afinidad comprende una o más de las sustituciones siguientes: (a) en la cadena pesada, V50L, V50Y, N52S, P52aS, N53Q, N53T, N53I, S56A, S56F, T57S, D58E, D58I, D58A, D58Y, o (b), en la cadena ligera, S91W, Y92F, T93N, T93S, T94G, P95Q, P95A, P95T, P96S, P96A, P96V.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 54. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 55. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 54 y un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 55.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 56. En una forma de realización, un anticuerpo de

la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 57. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 56 y un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 57.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 58. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, que comprende la secuencia del identificador de secuencia n.º: 59. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 58 y un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia del identificador de secuencia n.º 59.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados para unirse a DLL4. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo en DLL4 que cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Como es bien sabido en la materia, y como se describe en mayor detalle más adelante, el límite/la posición de los aminoácidos que delimitan una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de las diversas definiciones conocidas en la materia (como se describe más adelante). Algunas posiciones dentro de un dominio variable se pueden considerar posiciones hipervariables híbridas, en el sentido de que se puede considerar que estas posiciones están dentro de una región hipervariable según un conjunto de criterios, mientras que se considera que están fuera de una región variable según un conjunto de criterios distintos. Una o más de estas posiciones también se pueden encontrar en regiones hipervariables ampliadas (entendiendo estas como se definen más adelante).

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas formas de realización, el anticuerpo se selecciona en el grupo formado por un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con maduración de afinidad, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o scFv.

En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de unión a antígeno procedentes de un donante no humano trasplantadas a una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (por ejemplo, secuencias de dominio constante y/o estructura). En una forma de realización, el donante no humano es un ratón. En una forma de realización, la secuencia de unión a antígeno es sintética, por ejemplo, obtenida mediante mutagenia (por ejemplo, detección de representación en fagos, etc.). En una forma de realización, un anticuerpo quimérico de la invención tiene regiones V murinas y una región C humana. En una forma de realización, la región V murina de la cadena ligera se fusiona con una cadena ligera kappa humana. En una forma de realización, la región V murina de la cadena pesada se fusiona con una región C de IgG1 humana.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen aquellos que presentan sustituciones de aminoácidos en las variantes de la FR y con maduración de afinidad con cambios en las CDR trasplantadas. Los aminoácidos sustituidos en la CDR o FR no se limitan a los presentes en el anticuerpo donante o receptor. En otras formas de

realización, los anticuerpos de la invención también comprenden cambios en los residuos aminoácidos de la región Fc, lo que da lugar a una función efectora mejorada que incluye una mejor función de la CDC y/o ADCC y un aumento de la destrucción de linfocitos B. Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos con cambios específicos que mejoran la estabilidad. En otras formas de realización, los anticuerpos de la invención también comprenden cambios en los residuos aminoácidos de la región Fc que ocasionan una disminución de la función efectora, por ejemplo, una reducción de la función de la CDC y/o ADCC y/o una menor destrucción de linfocitos B. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una menor unión (como falta de unión) al factor de complemento humano C1q y/o al receptor Fc humano en las células naturales asesinas (NK). En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una reducción de la unión (como la falta de unión) a FcγRI, FcγRIIA, y/o FcγRIIIA humanos. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención pertenecen a la clase IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y comprenden al menos una mutación en E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración según el índice EU). En algunas formas de realización, los anticuerpos comprenden la mutación L234A/L235A o D265A/N297A.

En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos anti-DLL4 que comprenden alguna de las secuencias de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria descriptiva, donde los polipéptidos anti-DLL4 se unen específicamente a DLL4.

Los anticuerpos de la invención se unen (por ejemplo, se unen específicamente) a DLL4 y, en algunas formas de realización, pueden modular uno o más aspectos de los efectos asociados a DLL4, incluida la reducción o bloqueo de la activación del receptor Notch, la reducción o bloqueo de la señalización molecular después del extremo 3' del receptor Notch, la alteración o bloqueo de la unión a DLL4 del receptor Notch y/o la promoción de células endoteliales y/o la inhibición de la diferenciación de las células endoteliales y/o la inhibición de la diferenciación arterial y/o la inhibición de la perfusión vascular del tumor y/o el tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno de proliferación celular o neoplasia maligna; y/o el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de DLL4 y/o al tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad del receptor Notch. En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención se une específicamente a DLL4. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular (ECD) de DLL4. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende o contiene esencialmente el dominio extracelular de DLL4. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a DLL4 con una KD de 1 nM aproximadamente o superior; es decir, de 500 pM aproximadamente o superior. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a DLL4 humana con una k_{on} de 2×10^5 aproximadamente o superior, o 1×10^5 aproximadamente o superior. En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención reduce, inhibe y/o bloquea la actividad de DLL4 *in vivo* y/o *in vitro*. En algunas formas de realización, el anticuerpo compite por la unión con el ligando de DLL4 (reduce y/o bloquea la unión del receptor Notch a DLL4).

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y una molécula vehículo. En una forma de realización, la molécula vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-DLL4 de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de la invención y una molécula vehículo. En una forma de realización, la molécula vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo; por ejemplo, un vector recombinante, como un vector de expresión. Se puede utilizar cualquiera de diversas células huésped o anfitriones celulares. En una forma de realización, una célula huésped es una célula procariótica, por ejemplo, E. coli. En una forma de realización, una célula huésped es una célula eucariótica, por ejemplo, una célula de mamífero, como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En un aspecto, la invención proporciona métodos de elaborar un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona métodos de elaborar un anticuerpo anti-DLL4 (que, según se define en la presente memoria descriptiva, incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de estos) o inmunoconjugados y estos métodos comprenden la expresión en una célula huésped idónea de un vector recombinante de la invención que codifique ese anticuerpo (o un fragmento del mismo) y la recuperación del anticuerpo.

En un aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase; y una composición contenida dentro del envase, en el que la composición incluye uno o más anticuerpos anti-DLL4 de la invención. En una forma de realización, la composición comprende además un agente antiangiogénico. En una forma de realización el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab. En una forma de realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una forma de realización, una composición que incluye un anticuerpo comprende, además, una molécula vehículo, que, en algunas formas de realización, es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, una segunda composición está contenida dentro del envase, donde la segunda composición comprende un agente antiangiogénico. En una forma de realización, el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab. En una forma de realización, un artículo de fabricación de la invención comprende también instrucciones para la administración de la(s) composición(es) (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto (como instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria descriptiva).

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer envase que contiene una composición que incluye uno o más anticuerpos anti-DLL4 de la invención; y un segundo envase que comprende una solución tamponada. En una forma de realización, la solución tamponada es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, una composición que incluye un anticuerpo comprende, además, una molécula vehículo, que, en algunas formas de realización, es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un kit comprende también instrucciones para la administración de la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

En un aspecto, la invención permite usar un anticuerpo anti-DLL4 de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un cáncer, un tumor y/o un trastorno de

proliferación celular. En algunas formas de realización, el trastorno es un proceso patológico asociado a angiogénesis.

5 En un aspecto, la invención permite usar un ácido nucleico de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el trastorno es un proceso patológico asociado a angiogénesis.

10 En un aspecto, la invención permite usar un vector de expresión de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el trastorno es un proceso patológico asociado a angiogénesis.

En un aspecto, la invención permite usar una célula huésped de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el trastorno es un proceso patológico asociado a angiogénesis.

15 En un aspecto, la invención permite usar un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el trastorno es un proceso patológico asociado a angiogénesis.

20 En un aspecto, la invención permite usar un kit de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el trastorno es un proceso patológico asociado a angiogénesis.

La invención proporciona métodos y composiciones útiles para la modulación de estados de la enfermedad asociados a la expresión y/o actividad de DLL4, como aumento o disminución de la expresión y/o actividad o expresión y/o actividad no deseadas.

25 En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento o prevención de un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión y/o actividad de DLL4; los métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

30 En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear o prevenir el crecimiento de un tumor o la extensión de un cáncer; estos métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular y estos métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

35 En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un proceso patológico asociado a angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese

tratamiento. En algunas formas de realización, el proceso patológico asociado a angiogénesis es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el proceso patológico asociado a angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

Los métodos de la invención se pueden usar para influir en cualquier proceso patológico pertinente. En la presente memoria descriptiva se detallan trastornos a modo de ejemplo, entre los que destacan neoplasias malignas seleccionadas entre un grupo formado por cáncer de pulmón de células pequeñas, neuroblastomas, melanoma, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular, incluidas formas metastásicas de estas neoplasias malignas.

Los métodos de la invención pueden comprender también pasos adicionales de tratamiento. Por ejemplo, en una forma de realización, un método comprende, además, un paso en el que la célula y/o tejidos considerados diana terapéutica (por ejemplo, para una célula cancerosa) quedan expuestos a radioterapia o a quimioterapia o a un agente antiangiogénico.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para la detección de DLL4, los cuales comprenden la detección del complejo formado por DLL4 y anticuerpo anti-DLL4 en la muestra. Por "detección" se entiende en la presente memoria descriptiva la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de DLL4, los cuales incluyen la detección del complejo formado por DLL4 y anticuerpos anti-DLL4 en una muestra biológica procedente de un paciente que tenga o posiblemente tenga el trastorno. En algunas formas de realización, la expresión de DLL4 es una expresión aumentada o anómala. En algunas formas de realización, el trastorno es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-DLL4 descritos en la presente memoria descriptiva, donde el anticuerpo anti-DLL4 comprende un marcador detectable.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-DLL4 descritos en la presente memoria descriptiva y DLL4. En algunas formas de realización, el complejo está *in vivo* o *in vitro*. En algunas formas de realización, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-DLL4 está marcado de forma detectable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1a, b: Secuencias en bucle de la HVR de la cadena ligera y la cadena pesada de anticuerpos anti-DLL4. Las figuras muestran las secuencias de la HVR de la cadena pesada, H1, H2 y H3 y las secuencias de la HVR de la cadena ligera, L1, L2 y L3. La numeración de las secuencias es la siguiente: clon 152.26 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:1; HVR-H2 es el identificador de secuencia n.º:3; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:12); clon 152.26.6 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:1; HVR-H2 es el identificador de secuencia n.º:4; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:13); clon 152.26.14 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:2; HVR-H2 es el identificador de

secuencia n.º:3; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:14); clon 152.26.20 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:1; HVR-H2 es el identificador de secuencia n.º:5; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:15); clon 152.26.34 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:1; HVR-H2 es el identificador de secuencia n.º:6; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:16); clon 152.26.40 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:1; HVR-H2 es el identificador de secuencia n.º:7; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:17); y clon 152.26.82 (HVR-H1 es el identificador de secuencia n.º:1; HVR-H2 es el identificador de secuencia n.º:8; HVR-H3 es el identificador de secuencia n.º:9; HVR-L1 es el identificador de secuencia n.º:10; HVR-L2 es el identificador de secuencia n.º:11; HVR-L3 es el identificador de secuencia n.º:18).

Las posiciones aminoacídicas están numeradas según el sistema de numeración de Kabat, como se describe más adelante.

FIGURAS 2 y 3: muestran ejemplos de secuencias de estructura de consenso humanas de aceptor para uso en la aplicación de la invención con identificadores de secuencia, como se indica a continuación:

Estructuras de consenso variables de la cadena pesada (VH) (Figuras 2a, b)

estructura de consenso del subgrupo I humano de VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia n.º: 19)

estructura de consenso del subgrupo I humano de VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia núms: 20-22)

estructura de consenso del subgrupo II humano de VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia n.º: 23)

estructura de consenso del subgrupo II humano de VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia núms: 24-26)

estructura de consenso del subgrupo II humano de VH menos extendida

estructura de consenso del subgrupo III humano de VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia n.º: 27)

estructura de consenso del subgrupo III humano de VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia núms: 28-30)

estructura del aceptor humano de VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia n.º: 31)

estructura del aceptor humano de VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia núms: 32-33)

estructura del aceptor 2 humano de VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia n.º: 34)

estructura del aceptor 2 humano de VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia núms: 35-37)

Estructuras de consenso variables de la cadena ligera (VL) (Figura 3)

estructura de consenso del subgrupo I humano kappa de VL (identificador de secuencia n.º: 38)

estructura de consenso del subgrupo II humano kappa de VL (identificador de secuencia n.º: 39)

estructura de consenso del subgrupo III humano kappa de VL (identificador de secuencia n.º: 40)

estructura de consenso del subgrupo IV humano kappa de VL (identificador de secuencia n.º: 41)

FIGURA 4: muestra las secuencias de la región estructural de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números que aparecen como superíndice/en negrita indican posiciones de aminoácidos según Kabat.

FIGURA 5: muestra las secuencias modificadas o las variantes de secuencias de la región estructural de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números que aparecen como superíndice/en negrita indican posiciones de aminoácidos según Kabat.

FIGURA 6: muestra las regiones variables de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena ligera de los clones 26.20, 26.14 y 26.82 del anticuerpo.

FIGURA 7: La señalización de Notch mediada por DLL4 regulaba la proliferación de células endoteliales.

a-c, f Ensayos de formación de brotes de HUVEC en geles de fibrina tridimensionales. El anticuerpo anti-DLL4 (YW26.82) o DBZ promovía la formación de brotes de células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC) (a). La tinción con Ki67 puso de manifiesto que el anticuerpo anti-DLL4 o DBZ causaba hiperproliferación de las HUVEC (b). El anticuerpo anti-DLL4 o DBZ aumentaba la formación de brotes de HUVEC en presencia del medio de cultivo condicionado por SF (c). d, h, La administración sistémica del anticuerpo anti-DLL4 causaba acumulación masiva de células endoteliales en las retinas de neonatos. Imágenes confocales de escasa (arriba) y elevada (abajo) ampliación de la vasculatura de la retina (tinción con isolectina) (d). La tinción con Ki67 muestra un aumento de la proliferación de células endoteliales en las retinas de neonatos tratadas con anticuerpo anti-DLL4 (h). e, La activación de Notch mediante DLL4 inmovilizado inhibía la proliferación de HUVEC. f, El anticuerpo anti-VEGF inhibía la formación de brotes de HUVEC en presencia o ausencia de DBZ. g, Regulación del VEGFR2 mediante Notch. Análisis cuantitativo mediante PCR de la expresión del VEGFR2 en respuesta al bloqueo de Notch en cultivos de gel de fibrina tridimensionales de HUVEC (7 d) por anticuerpo anti-DLL4 o DBZ (izquierda) o activación de Notch en cultivo bidimensional de HUVEC (36 horas) por DLL4 inmovilizado (derecha). El anticuerpo anti-DLL4 y DBZ se utilizaron a 5 µg/ml y 0,08 µM, respectivamente (a-c, e-g).

FIGURA 8: La señalización de Notch mediada por DLL4 regulaba la diferenciación de células endoteliales.

a, Las estructuras con forma de luz (flechas blancas) formadas por HUVEC cultivadas en geles de fibrina se perdían en presencia del anticuerpo anti-DLL4 o DBZ. En cambio, los brotes estaban repletos de células (flechas negras). b, Regulación de TGFβ2 mediante Notch. Análisis cuantitativo mediante PCR de la expresión del TGFβ2 en respuesta al bloqueo de Notch en cultivos de gel de fibrina tridimensionales de HUVEC (7 d) por anticuerpo anti-DLL4 o DBZ (izquierda) o activación de Notch en cultivo bidimensional de HUVEC (36 horas) por DLL4 inmovilizado (derecha). c, El anticuerpo anti-DLL4 bloquea el desarrollo arterial. Imágenes confocales de retinas de ratones neonatos sometidas a tinción con actina alfa de músculo liso (ASMA) e isolectina. Se trató a los ratones neonatos como se describe en la Fig. 1d. d, Imágenes confocales de retinas de ratón adulto sometidas a tinción con ASMA e isolectina. Se trató a ratones de 8 semanas de vida con PBS o anticuerpo anti-DLL4 (10 mg/kg, dos veces a la semana) durante dos semanas.

FIGURA 9: El bloqueo selectivo de DLL4 y/o VEGF alteraba la angiogénesis tumoral e inhibe el crecimiento tumoral. a-f, Resultados de modelos de tumor: HM7 (a), Colo205 (b), Calu6 (c), MDA-MB-435 (d), MV-522 (e) y WEHI3 (f). Se presenta la media de los volúmenes tumorales, con su error estándar (EE). g-h, Estudios histológicos de la vasculatura tumoral. Estudios inmunohistoquímicos del anticuerpo anti-CD31 en cortes del tumor

EL4 en comparación con ratones control y ratones tratados con anticuerpo anti-DLL4 y anticuerpo anti-VEGF (g). Perfusión de lectina y tinción con anti-CD31 en cortes de tumor EL4 (h). i-p. Resultados de los modelos de tumor SK-OV-3X1 (i), LL2 (j), EL4 (k), H1299 (l), SKMES-1 (m), MX-1 (n), SW620 (o) y LS174T (p).

FIGURA 10: El DLL4/Notch no era importante para la homeostasis del intestino de ratón. Estudios inmunohistoquímicos del intestino delgado de ratones control (a, d, g, j), ratones tratados con anticuerpo anti-DLL4 (10 mg/kg, dos veces al semana durante 6 semanas) (b, e, h, k) y ratones tratados con DBZ (30 μ mol/kg al día durante 5 días) (c, f, i, l). Como se observa mediante tinción con hematoxilina y eosina (a, b, c) y tinción con azul alciano (d, e, f), DBZ ocasionó la sustitución de la población de células transitorias amplificadoras por células caliciformes. Este cambio no se observó en ningún momento en el tratamiento con anticuerpo anti-DLL4. La tinción con Ki67 (g, h, i) y HES-1 (j, k, l) confirmó una vez más que el anticuerpo anti-DLL4 no reproducía el efecto de DBZ.

FIGURA 11: Caracterización del anticuerpo anti-DLL4. a, Mapeo del epítipo del anticuerpo monoclonal (Mab) anti-DLL4 YW26.82. Representación esquemática de un conjunto de mutantes de DLL4 expresados como proteínas de fusión con fosfatasa alcalina (AP) placentaria humana en el extremo C terminal. Se llevaron a cabo ensayos de los medios de cultivo condicionados de células 293T que contenían las proteínas de fusión en 96 pocillos de placas de microtitulación recubiertas con anticuerpo anti-DLL4 purificado (YW26.82, 0,5 μ g/ml). La unión DLL4-AP se detectó utilizando PNPP en una sola fase (Pierce) como sustrato y una medición de la absorbancia (OD) a 405 nm. b-d, Unión selectiva de YW26.82 a DLL4. Se revistieron las placas Nunc MaxiSorp™ de 96 pocillos con proteínas recombinantes purificadas como se indica (1 μ g/ml). La unión de YW26.82 a las concentraciones indicadas se midió utilizando el ensayo ELISA. Los anticuerpos unidos se detectaron con el conjugado de HRP con anticuerpo antihumano usando TMB como sustrato y una lectura de la absorbancia (OD) a 450 nm. Como control durante el ensayo se utilizaron ErbB2-ECD recombinante y anticuerpo anti-HER2 (b). Análisis FACS de 293 células transfectadas de forma transitoria con vector, DLL4 de longitud completa, Jag1 o DLL1. Sólo se detectó unión significativa de YW26.82 en células transfectadas con DLL4 (panel superior). La expresión de Jag1 y DLL1 se confirmó mediante la unión de Notch1-Fc murino recombinante (rrNotch1-Fc, panel central) y Notch2-Fc murino recombinante (rrNotch2-Fc, panel inferior), respectivamente. Se utilizaron YW26.82, rrNotch1-Fc o rrNotch2-Fc (R&D System) a 2 μ g/ml, seguido de IgG-PE antihumana de cabra (1:500, Jackson ImmunoResearch) (c). El anticuerpo anti-DLL4 bloqueó la unión de DLL4-AP, pero no de DLL1-AP, a rNotch1 recubierto, con una IC50 calculada de 12 nM aproximadamente (panel izquierdo). El anticuerpo anti-DLL4 bloqueaba la unión de DLL4-His, pero no de Jag1-His, a rNotch1 recubierto, con una IC50 calculada de 8 nM aproximadamente (panel derecho) (d). e, Unión específica de YW26.82 a DLL4 expresado de forma endógena. Análisis FACS de HUVEC transfectadas con ARNsi específico de DLL4 o control. YW26.82 se utilizó a 2 μ g/ml, seguido de IgG-PE antihumana de cabra (1:500, Jackson ImmunoResearch) (e).

FIGURA 12: Regulación ascendente de DLL4 mediante activación de Notch. Las HUVEC fueron estimuladas mediante DLL4 humano marcado con His inmovilizado en el extremo C terminal (aminoácidos 1-404) en ausencia o presencia de DBZ (0,08 μ M). Treinta y seis horas después de la estimulación, se estudió la expresión endógena de DLL4 mediante análisis FACS con anticuerpo anti-DLL4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención contenida en la presente memoria descriptiva proporciona anticuerpos anti-DLL4, que son útiles, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de procesos patológicos asociados a la expresión y/o actividad de DLL4, como aumento de la expresión y/o actividad o expresión y/o actividad no deseadas. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se utilizan para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se utilizan para tratar un proceso patológico asociado a angiogénesis.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-DLL4 de la invención tienen utilidad como reactivos para la detección y/o aislamiento de DLL4, como la detección de DLL4 en diversos tejidos y tipos celulares.

La invención proporciona, además, métodos de elaboración de anticuerpos anti-DLL4 y polinucleótidos que codifiquen anticuerpos anti-DLL4.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente memoria descriptiva se conocen bien, por lo general, y se emplean habitualmente con la metodología tradicional usada por los expertos en la materia, como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas y descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

Un anticuerpo "aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo, incluyendo enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En las formas de realización preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia N terminal o interna de aminoácidos mediante un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción con azul de Coomassie™ o, preferentemente, plata.

Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Asimismo, un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo en el medio que circunda a las células recombinantes. En cualquier caso, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de, al menos, una molécula contaminante de ácido nucleico con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o entorno en los que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico que existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una

molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula del ácido nucleico está en una posición cromosómica distinta de la que tiene en las células naturales.

El término "numeración de residuos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat", y las variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios de la cadena variable de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o CDR del dominio variable o a una inserción en ellas. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después de un residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede estar determinada para un anticuerpo dado por una alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

Las frases "sustancialmente similar" o "sustancialmente el/la mismo(a)", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, denotan un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por lo general, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de control/referencia), de forma que alguien experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores de escasa o ninguna significación estadística y/o biológica dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre estos dos valores es, preferiblemente, inferior al 50% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 40% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 30% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 20% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 10% aproximadamente como función del valor para el anticuerpo de control/referencia.

Por "afinidad de unión" generalmente se entiende la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula de enlace (por ejemplo, un antígeno). Salvo indicación en contrario, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su molécula de enlace Y se puede representar por lo general mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la especialidad, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos de baja afinidad se suelen unir al antígeno lentamente y se suelen disociar de inmediato, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen al antígeno con mayor rapidez, por lo general, y suelen permanecer unidos más tiempo. Existen diversos métodos para medir la afinidad de unión conocidos en la especialidad y todos ellos se pueden utilizar para los fines de la presente invención. A continuación, se describen, a modo de ejemplo, formas de realización específicas.

En una forma de realización, la "Kd" o el "valor Kd" según esta invención se mide mediante un ensayo de unión a antígenos radiomarcados (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, descrito por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de los Fab a antígenos equilibrando los Fab con una concentración mínima del antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulación de

antígeno no marcado y, luego, capturando el antígeno unido con una placa con revestimiento de anticuerpos anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) permanecen recubiertas durante toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6) y, a continuación, son bloqueadas con 2% (p/v) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (23 °C aproximadamente). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno marcado con [¹²⁵I] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, que concuerde con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante toda la noche; no obstante, la incubación puede continuar durante más tiempo (por ejemplo, 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween®20 al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint™-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TopCount (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que proporcionan menos del 20% de unión máxima o un 20% para uso en ensayos de unión competitivos.

Según otra forma de realización, el Kd o valor Kd se mide utilizando un análisis de resonancia plasmón de superficie que usa BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, New Jersey) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Los biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína emparejada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyecta el doble de diluciones seriadas de Fab (0,78 nM a 500 mM) en PBS con 0,05% de Tween®20 (PBST) a 25°C a un caudal de 25 µl/min aproximadamente. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) al encajar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como el cociente k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la tasa de asociación excede de 106 M⁻¹ S⁻¹ según el ensayo de resonancia plasmón de superficie mencionado anteriormente, la tasa de asociación se puede determinar utilizando una técnica de absorción fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de frecuencia) a 25 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones cada vez más elevadas de antígeno según medición en un espectrómetro, como un espectrómetro equipado con módulo "stop-flow" (interruptor de flujo) (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitador.

Según esta invención, también se puede determinar la "tasa de asociación" o " k_{on} " con la misma técnica de resonancia plasmón de superficie descrita anteriormente utilizando BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, New Jersey) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Los biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-

dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína emparejada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyecta el doble de diluciones seriadas de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween@20 (PBST) a 25°C a un caudal de 25 µl/min aproximadamente. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) al encajar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como el cociente k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Sin embargo, si la tasa de asociación excede de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ según el ensayo de resonancia plasmón de superficie mencionado anteriormente, la tasa de asociación se determina, preferentemente, utilizando una técnica de absorción fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de frecuencia) a 25 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones cada vez más elevadas de antígeno según medición en un espectrómetro, como un espectrómetro equipado con módulo "stop-flow" (interruptor de flujo) (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitador.

En la presente memoria descriptiva, por "vector" se entiende una molécula de un ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", término que hace referencia a un bucle de ADN circular de doble hebra al que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos adicionales de ADN se pueden ligar al genoma vírico. Algunos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en el huésped celular en el que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales en mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales en mamíferos) se pueden integrar en el genoma de un huésped celular al introducirse en el huésped y, de este modo, se replican al mismo tiempo que el genoma del huésped. Asimismo, hay vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados por su función. Estos vectores se denominan, en la presente memoria descriptiva, "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante tienen con frecuencia la forma de plásmidos. En la presente especificación, los términos "plásmido" y "vector" son intercambiables, dado que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente usada.

En la presente memoria descriptiva, "polinucleótido", o "ácido nucleico", son términos usados indistintamente 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 a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y sus análogos. De estar presente, la modificación de la estructura del nucleótido se puede producir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede verse interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse nuevamente tras la síntesis, por ejemplo mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "cofías", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se

producen de forma natural por un análogo; modificaciones de enlaces internucleótidos, como aquellas en las que intervienen enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.); las que contienen porciones colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.); las que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.); las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.); las que contienen alquilantes; las que contienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Asimismo, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos de fosfonatos, grupos fosfatos, protegerse mediante grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse a soportes sólidos o semisólidos. El OH de los extremos 5' y 3' terminales puede fosforilarse y sustituirse por aminas o porciones de grupos orgánicos en casquete (capping) de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la materia, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleósidos básicos como metil ribosida. Uno o más enlaces de fosfodiéster pueden sustituirse por otros grupos de enlace alternativos. Estos grupos alternativos de enlace incluyen formas de realización en las que el fosfato es sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1 a 20 C) que contiene opcionalmente un enlace a éter (-O-), aril, alquenal, cicloalquil, cicloalquenal o aradil. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente memoria descriptiva, incluido el ARN y el ADN.

En la presente memoria descriptiva, por "oligonucleótido" se entiende, por lo general, polinucleótidos cortos, habitualmente de hebra única y sintéticos, que suelen tener una longitud inferior a 200 nucleótidos, aunque no necesariamente. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anteriormente incluida sobre polinucleótidos es aplicable igualmente y en su integridad a los oligonucleótidos.

El "Porcentaje (%) de identificación de la secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptidos o polipéptidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identificación de la secuencia y no considerar ninguna sustitución conservadora parte de la identificación de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en este ámbito; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o MegAlign (DNASTAR). Los expertos en este campo pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores porcentuales de identificación de la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el software de comparación de

secuencias ALIGN-2. Dicho software fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido presentado, junto con la documentación del usuario, en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está inscrito con el n.º de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genentech, Inc., South San Francisco, California. Este programa debe ser compilado para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias, que no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia aminoacídica A con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B (lo que también se puede expresar diciendo que una determinada secuencia aminoacídica A tiene o contiene un porcentaje concreto de identificación de la secuencia aminoacídica con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en la que X es la cantidad de residuos de aminoácidos establecidos como coincidencia total por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de A y B por ese programa, y en la que Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se detectará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual que la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual que el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

Salvo indicación expresa en contrario, todos los valores del porcentaje de la identificación de la secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se ha descrito en el párrafo precedente, utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "DLL4" (también llamado indistintamente "delta-like 4"), como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere, salvo indicación expresa o salvo que del contexto se desprenda otro sentido, a cualquier polipéptido nativo de DLL4 o a cualquier variante del polipéptido de DLL4 (sea nativo o sintético). El término "secuencia nativa" engloba específicamente formas segregadas o truncadas que se producen de forma natural (por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular), las variantes que se producen de forma natural (por ejemplo, formas alternativas de ajuste) y las variantes alélicas que se producen de forma natural. El término "DLL4 de tipo natural" suele referirse a un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de una proteína de DLL4 que se produce naturalmente. El término "secuencia de DLL4 de tipo natural" suele referirse a una secuencia de aminoácidos encontrada en una DLL4 que se produce naturalmente.

El término "Receptor Notch" (también llamado indistintamente "Notch"), como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere, salvo indicación expresa o salvo que del contexto se desprenda otro sentido, a cualquier polipéptido nativo del receptor Notch o a cualquier variante del polipéptido del receptor Notch (sea nativo o sintético). Los humanos tienen cuatro receptores Notch (Notch1, Notch 2, Notch3 y Notch4). En la presente memoria descriptiva, el término "Receptor Notch" incluye cualquiera de los cuatro receptores Notch humanos o todos ellos. El término "secuencia nativa" engloba específicamente formas segregadas o truncadas que se producen

de forma natural (por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular), las variantes que se producen de forma natural (por ejemplo, formas alternativas de ajuste) y las variantes alélicas que se producen de forma natural. El término "receptor Notch de tipo natural" suele referirse a un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de una proteína del receptor Notch que se produce naturalmente. El término "secuencia del receptor Notch de tipo natural" suele referirse a una secuencia de aminoácidos encontrada en un receptor Notch que se produce naturalmente.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto en cuanto presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpos (como se describe con mayor detalle en la presente memoria descriptiva). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con maduración de afinidad.

El término "variable" hace referencia al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto con respecto a su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones de determinación de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) de los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro regiones FR que, en su mayor parte, adoptan una configuración de hoja- β , y están conectadas por tres CDR, que crean bucles que conectan la estructura de la hoja- β , y en algunos casos forman parte de ella. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas y en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, junto a las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de los cuales tiene un solo punto de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y sigue siendo capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

El "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. En una especie Fv de dos cadenas, esta región está compuesta por un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena única, un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera se pueden enlazar covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de forma que las cadenas pesada y ligera se asocien en una estructura "dimérica" análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. En esta configuración, las tres regiones CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones CDR confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante,

incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la denominación que se da en la presente memoria descriptiva al Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes presentan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier vertebrado pueden asignarse a una de dos clases claramente diferenciadas, denominadas kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden seguir dividiéndose en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Los "fragmentos de anticuerpos" contienen únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en la que la porción conserva al menos una de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto, aunque es preferible que conserve la totalidad o la mayoría de estas funciones. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos están los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, los diacuerpos, los anticuerpos lineales, las moléculas anticuerpos de cadena única y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo contiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, conserva la capacidad para unirse al antígeno. En otra forma de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que contiene la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas habitualmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función de la ADCC y la unión a complemento. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que *in vivo* tiene una semivida sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de este tipo puede contener un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia Fc capaz de dar estabilidad *in vivo* al fragmento.

En la presente memoria descriptiva, por "región hipervariable", "HVR" o "HV" se entienden las regiones de un dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Por lo general, los anticuerpos contienen seis regiones hipervariables: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En la presente memoria descriptiva se usan y engloban diversas delineaciones de regiones hipervariables. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de las secuencias y son las más frecuentemente usadas (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de un anticuerpo monoclonal (AbM) representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y son las utilizadas en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. A continuación, se indican los residuos procedentes de cada una de estas regiones hipervariables.

Bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto
---	---	-----	-----
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables ampliadas" como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable están numerados según Kabat *et al.*, como se ha indicado anteriormente para cada una de estas definiciones.

Los residuos de una "estructura" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos a los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

El término "anticuerpo monoclonal", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo o a los mismos epítomos, excepto en el caso de posibles variantes que pudiesen surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, las cuales, por lo general, estarían presentes en cantidades insignificantes. Generalmente, dicho anticuerpo monoclonal incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que se une a una diana, donde dicha secuencia de polipéptidos unida a una diana se obtiene mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia de

polipéptidos única unida a una diana a partir de una gran variedad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el proceso de selección puede consistir en la selección de un único clon a partir de una gran variedad de clones, como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones del ADN recombinante. Debería entenderse que la secuencia seleccionada de unión a una diana puede sufrir más alteraciones; por ejemplo, para mejorar la afinidad con la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su inmunogenicidad *in vivo*, crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia alterada de unión a una diana es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que generalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales actúa contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que no suelen estar contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo del que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo utilizando un método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilicen de conformidad con la presente invención pueden obtenerse a partir de diversas técnicas, incluido, por ejemplo, el método del hibridoma (p.ej., Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos del ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 4.816.567), tecnología de representación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o semejantes a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci inmunoglobulínicos humanos o genes que codifican secuencias de la inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); las Patentes de EE.UU. núms. 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm) y 5.545.807; el documento WO 1997/17852; las patentes de EE.UU. núms. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, los murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata, el conejo o los primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden

comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos) en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente de una inmunoglobulina humana. Para más información, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que las demás cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567 y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Por "anticuerpo humanizado" como se emplea en la presente memoria descriptiva se entiende un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Los fragmentos "Fv de cadena simple" o "scFv" de un anticuerpo comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo y estos dominios están presentes en una cadena única de polipéptidos. Por lo general, el polipéptido scFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que un anticuerpo se puede unir selectivamente. El antígeno diana puede ser un polipéptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un lípido, un hapteno o un compuesto de ellos, sintético o que se produzca naturalmente. El antígeno diana es, preferiblemente, un polipéptido.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH - VL). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, estos dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea EP 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo humano" es aquel que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producción de anticuerpos humanos expuestas en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contenga residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo con "maduración de afinidad" es aquél con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo padre que no incluye dichas alteraciones. Los anticuerpos con maduración de afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en la materia. En Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad a través de la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la CDR y/o los residuos estructurales se describen en: Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de una secuencia nativa o la región Fc variable de una secuencia aminoacídica) de un anticuerpo, y puede variar con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: La unión de C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento, la unión a receptores de Fc, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de las células B.

La "citotoxicidad dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual una Ig secretada y unida a los receptores Fc (FcRs) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porte un antígeno y, posteriormente, destruyan dicha célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. núms. 5.500.362 ó 5.821.337 o se puede realizar el ensayo de Presta que se describe en la patente de Estados Unidos 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función efectora de la ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC están las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, siendo las PBMC y las NK las células preferentes. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano con secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo anti-IgG (un receptor gamma) e incluye las subclases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo

las variantes alélicas y las formas de ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias aminoacídicas similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (véase reseña M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991), Capel *et al.*, *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995) también se revisan los FcR. Otros FcR, incluidos aquellos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva. Este término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es el responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas. El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con capacidad de unión mejorada o disminuida a los FcR. El contenido de esta publicación de patente se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Se conocen los métodos de medición de la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida sérica de los polipéptidos de unión al FcRn humano de alta afinidad pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos de variante Fc.

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La vía clásica de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como, por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a CqI se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Por "polipéptido que comprende una región Fc" se entiende un polipéptido, como un anticuerpo o una inmunoadhesina (véase la definición más adelante), que comprende una región Fc. La lisina en el extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede ser eliminada, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido, o recombinando el ácido nucleico que codifica al polipéptido. Por lo tanto, una composición que contenga un polipéptido con una región Fc según esta invención puede comprender polipéptidos con el K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el residuo K447.

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferentes inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

En la presente memoria descriptiva, un "anticuerpo agonista" es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

A efectos de la presente memoria descriptiva, una "estructura humana del aceptor" es una estructura que comprende la secuencia aminoacídica de una estructura de VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulinas humanas, o de una estructura de consenso humana. Una estructura humana del aceptor "derivada de" una estructura de inmunoglobulinas humanas o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de estas o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En el caso de que estén presentes cambios en la secuencia de aminoácidos, habrá preferentemente un máximo de 5 y, preferentemente, 4 o menos, o 3 o menos cambios preexistentes de aminoácidos. En el caso de que haya cambios preexistentes de aminoácidos en una VH, estos cambios, preferentemente, están solo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una forma de realización, la estructura humana del VL del aceptor tiene una secuencia idéntica a la de la estructura del VL de la inmunoglobulina humana o a la estructura de consenso humana.

Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa el residuo de aminoácidos más frecuente en una selección de secuencias de estructura del VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias del VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza en un subgrupo de secuencias de dominio variable. El subgrupo de secuencias suele ser un subgrupo como en Kabat *et al.* En una forma de representación, para VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En una forma de representación, para VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *et al.*

Una "estructura de consenso del subgrupo III del VH" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III variable pesado de Kabat *et al.* En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo III VH comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (identificador de secuencia n.º: 42)-HI-WVRQAPGKGLEWV (identificador de secuencia n.º: 43)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (identificador de secuencia n.º: 44)-H3-WGQGTLVTVSS (identificador de secuencia n.º: 45).

Una "estructura de consenso del subgrupo I del VL" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable ligero de Kabat *et al.* En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo I VH comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (identificador de secuencia n.º: 46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (identificador de secuencia n.º: 47)-L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC (identificador de secuencia n.º: 48)-L3-FGQGTKVEIK (identificador de secuencia n.º: 49).

Un "trastorno" o "enfermedad" es un proceso que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, comprendidos los procesos patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos de trastornos que se tratarán según lo establecido en la presente memoria descriptiva son tumores malignos y benignos, carcinoma, blastoma y sarcoma.

Los términos "trastorno de la proliferación celular" y "trastorno de la proliferación" se refieren a trastornos asociados a algún grado de proliferación celular anómala. En una forma de realización, el trastorno de la proliferación celular es un cáncer:

En la presente memoria descriptiva, por "tumor" se entiende todo crecimiento y proliferación celular neoplásica, tanto benigna como maligna, así como todas las células y tejidos cancerosos y precancerosos. Tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno de proliferación celular", "trastorno de proliferación" y "tumor" no se excluyen mutuamente.

Los términos "cáncer y "canceroso" describen o se refieren al estado fisiológico de los mamíferos típicamente caracterizado por un crecimiento/proliferación celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer están carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más concretos de estas clases de cáncer son el cáncer de células escamosas, el cáncer de células pulmonares pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar escamoso, el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivales, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el cáncer de estómago, el melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. La disregulación de la angiogénesis puede ocasionar muchos trastornos que se pueden tratar mediante las composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen procesos neoplásicos y no neoplásicos. Los procesos neoplásicos incluyen los descritos anteriormente. Entre los procesos no neoplásicos se encuentran, entre otros, la hipertrofia aberrante o no deseada, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas, incluida retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de trasplante de córnea, rechazo de trasplante de córnea, neovascularización retiniana/del coroides, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluida enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/síndrome de distrés respiratorio del adulto, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado a infarto cerebral/traumatismo craneal cerrado/traumatismo), inflamación sinovial, formación de paño en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades en el tercer espacio de fluido (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica como enfermedad intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn et alitis ulcerosa), rechazo de trasplante renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrítico, crecimiento de masa tisular anómala o no deseada (no cáncer), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del cabello, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preclampsia, ascitis, efusión pericárdica (como la asociada a pericarditis) y efusión pleural.

En la presente memoria descriptiva, por "tratamiento" se entiende una intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo o célula tratada y se puede realizar como prevención o durante la evolución de la enfermedad. Son efectos deseables del tratamiento la prevención de la enfermedad o de su recidiva, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución del ritmo de progresión de la enfermedad, la mejora o los cuidados paliativos del estado de la enfermedad y la remisión o un pronóstico de mejoría. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Por "sujeto" se entiende un vertebrado, preferiblemente un mamífero y, especialmente, un humano. Los mamíferos incluyen animales de granja (como vacas), animales utilizados en actividades deportivas; animales de compañía (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

A efectos de tratamiento, por "mamífero" se entiende cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, animales de compañía, utilizados en actividades deportivas, o en zoos, como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios, para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista, para dar lugar a una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella a la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se ven contrarrestados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios, para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Habitualmente, aunque no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "agente citotóxico" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las mismas. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorrubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de estas como nucleoliticenzimas, antibióticos y toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de estos y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales que se describen más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida ocasiona la destrucción de las células tumorales.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos serían los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos

(en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; los gases nitrógeno como el clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (por ejemplo, la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma 11 y la omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteína relacionados (las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-díazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato; los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestano, el mepitioestano, la testolactona los antiadrenérgicos como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiourea; el lentinán; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; el pentostatin; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbicina; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofirán; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2''-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbicina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor (ABRAXANE™) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y el doxetaxel (TAXOTERE®) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony,

Francia); el clorambucil; la gemcitabina (GEMZAR®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metatrexato; los análogos de platino o los basados en platino como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y se presentan a menudo en la forma de un tratamiento sistémico, es decir, que afecta a todo el organismo. Estos agentes pueden ser hormonas. Como ejemplos tendríamos los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERD); los agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; otros antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasas que inhiben el enzima aromatasas, encargado de regular la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), el letrozol (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEÚVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa I LURTOTECAN®; el rmRH ABARELIX®; el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña doble tirosinasa del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

Por "agente inhibidor del crecimiento" se entiende, en el contexto de la presente memoria descriptiva, un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (como una célula que exprese DLL4) tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser un agente que reduzca significativamente el porcentaje de células (como una célula que exprese DLL4) en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del

crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" ["Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos"] por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son antineoplásicos derivados ambos del tejo del Pacífico. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer) se deriva del tejo europeo y es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven la unión de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al prevenir la despolimerización, que ocasiona la inhibición de la mitosis en células.

La "doxorubicina" es un antibiótico antraciclina. La denominación química completa de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

Por "composición antineoplásica" se entiende una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente antineoplásico". Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anticancerosos, también denominados "agentes antineoplásicos" en la presente memoria descriptiva) son agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulina, toxinas y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpo neutralizador anti-VEGF, antagonista de VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de la tirosinasa), inhibidor de HER1/EGFR, erlotinib, un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplos, anticuerpos neutralizadores) que se une a uno o más de los receptores de ErbB2, ErbB3, ErbB4 o VEGF, inhibidores para tirosinasa de receptores para factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y/o factor de células madre (SCF) (por ejemplo, imatinib, mesilate (Gleevec ® Novartis)), TRAIL/Apo2L y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos, etc.

El término "profármaco", tal como se usa en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales que el fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, págs. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, entre otros, profármacos con fosfato, profármacos con tiofosfato, profármacos con sulfato, profármacos con péptidos, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactam, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden

transformarse en el fármaco más activo no citotóxico. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivatizados para obtener un profármaco para su uso en esta invención son los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor angiogénico" es una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o siARN)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhiben la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseada, bien directa bien indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista a un agente angiogénico tal como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos contra receptores del VEGF, fragmentos solubles del receptor del VEGF o pequeñas moléculas que bloquean la señalización de los receptores del VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (sunitinib malato), AMG706, o las descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores nativos de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3, que enumera los tratamientos antiangiogénicos en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2, que enumera factores antiangiogénicos); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1, que enumera antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

Composiciones de la invención y métodos para su elaboración

Esta invención engloba composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-DLL4, y polinucleótidos, que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo anti-DLL4. Como se usa en la presente memoria descriptiva, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a DLL4 y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a DLL4. Estas composiciones pueden contener, además, vehículos aptos, como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyan soluciones tamponadas, que son bien conocidas en la materia.

La invención también engloba formas de realización de polinucleótidos y anticuerpos aislados. La invención también engloba formas de realización de polinucleótidos y anticuerpos sustancialmente puros.

Los anticuerpos anti-DLL4 de la invención son preferiblemente monoclonales. También se incluyen dentro del ámbito de la invención fragmentos de anticuerpos como los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂, de los anticuerpos anti-DLL4 proporcionados en la presente memoria descriptiva. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear por medios tradicionales, como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos que se exponen a continuación.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto en posibles mutaciones de formación natural que pueden estar presentes en cantidades insignificantes. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Pueden conseguirse los anticuerpos monoclonales anti-DLL4 de la invención por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o con el método del ADN recombinante (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza a un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster, para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos anti-DLL4 se producen generalmente en animales mediante varias inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de DLL4 y un adyuvante. La DLL4 se puede preparar usando métodos bien conocidos en este ámbito, algunos de los cuales se describen con más detalle en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, la producción recombinante de DLL4 se describe más adelante. En una forma de realización, se inmuniza a los animales con un derivado de DLL4 que contiene el dominio extracelular (ECD) de DLL4 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una forma de realización preferida, se inmuniza a los animales con una proteína de fusión DLL4-IgG1. Los animales suelen ser inmunizados contra conjugados inmunogénicos o derivados de DLL4, con monofosforil lipido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta intradérmicamente en múltiples puntos. Dos semanas más tarde, los animales reciben una dosis de recuerdo. Entre 7 y 14 días más tarde se extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos anti-DLL4. Los animales reciben dosis de recuerdo hasta que se alcancen los niveles adecuados de titulación.

De manera alternativa, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como por ejemplo polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Por lo tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales no contienen la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que contienen sustancias que previenen el crecimiento de células deficitarias en HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, como las derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11, disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. También se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma murino-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Se analiza el medio de cultivo en el cual crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra DLL4. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos

monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, **107**:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden obtener mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* en un animal como tumores con ascitis.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos anti-DLL4 de la invención se pueden obtener utilizando librerías combinatorias para detectar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante la detección de bibliotecas de fagos que contienen fagos que representan diversos fragmentos de la región variable (Fv) de los anticuerpos fusionados a la proteína de la cápside del fago. Estas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad para detectar el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y, de este modo, separados de los clones de la biblioteca que no tienen capacidad de unión. Los clones con capacidad de unión se eluyen entonces del antígeno y pueden enriquecerse aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-DLL4 de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento apropiado de detección de antígenos para seleccionar el clon del fago de interés, seguido por la construcción de un clon del anticuerpo anti-DLL4 de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) convenientes, descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo está formado a partir de dos regiones variables (V) de unos 110 aminoácidos, una correspondiente a la cadena ligera (VL) y otra correspondiente a la cadena pesada (VH), que presentan en ambos casos tres bucles hipervariables o regiones de determinación de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden representar funcionalmente en el fago, bien como fragmentos de Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL estén covalentemente enlazados por medio de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que estén fusionados a un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, **12**: 433-455 (1994). Como se usa en la presente memoria descriptiva, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar aleatoriamente en librerías de fagos, en las que se puede buscar por clones de unión a antígeno, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, **12**: 433-455 (1994). Las bibliotecas procedentes de

fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio virgen se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos a una gran variedad de antígenos extraños y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, las librerías vírgenes también se pueden producir sintéticamente mediante la clonación de segmentos de genes V no reorganizados procedentes de células madre y utilizando cebadores de la PCR que contenga secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 muy variables y para conseguir la reorganización *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

El fago filamentoso se utiliza para representar fragmentos de anticuerpos mediante fusión a la proteína de la cápside menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden representar como fragmentos Fv de cadena única, en los que los dominios de VH y VL están conectados a la misma cadena polipeptídica mediante un separador de polipéptidos flexible, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otras se segregan en el periplasma del anfitrión celular bacteriano donde el ensamblaje de una estructura proteínica de la cápside de Fab se representa en la superficie del fago mediante el desplazamiento de las proteínas de la cápside de tipo natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de inmunocitos recolectados de humanos o animales. Si se desea una librería que presente un sesgo a favor de clones anti-DLL4, el sujeto es inmunizado con DLL4 para generar una respuesta a anticuerpos y las células esplénicas y/o los linfocitos B circulantes u otros linfocitos de la circulación periférica se recuperan para la construcción de la librería. En una forma de realización preferente, una librería de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de clones de anti-DLL4 humana se obtiene generando una respuesta a un anticuerpo anti-DLL4 en ratones transgénicos portadores de una matriz de genes humanos funcionales de la inmunoglobulina (y carentes de un sistema funcional de producción de anticuerpos endógenos), de forma que la inmunización con DLL4 da lugar a linfocitos B productores de anticuerpos humanos anti-DLL4. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas anti-DLL4 se puede obtener mediante un procedimiento de detección adecuado para aislar linfocitos B que expresen un anticuerpo unido a membrana específico de DLL4, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad a DLL4 o adsorción de células a DLL4 marcada con flurocromo seguida por separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Alternativamente, el uso de células esplénicas y/o linfocitos B u otros PBL procedentes de un donante no inmunizado ofrece una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una librería de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que DLL4 no es antigénica. En el caso de bibliotecas que incorporen construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, las células madre se recolectan del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no organizados. Los inmunocitos de interés se pueden obtener de diversas especies animales, como humanos, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y especies aviares, etc.

Los segmentos de regiones variables de genes de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluidos los segmentos VH y VL) se recuperan a partir de las células de interés y se amplifican. En el caso de librerías de genes de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado se puede obtener aislando el ADN o el ARNm genómico de los linfocitos, seguido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se acoplen a los extremos 5' y 3' de los genes de la VH y la VL reorganizados, como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), lo que permite obtener diversos repertorios de genes V para su expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir del ADNc y del ADN genómico con cebadores reversos en el extremo 5' del exon que codifica el dominio V maduro y cebadores anversos dentro del segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, los cebadores reversos también se pueden situar en el exon líder, como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y los cebadores anversos dentro de la región constante, como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar la degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). Preferiblemente, la diversidad de las librerías se maximiza utilizando cebadores de la PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las organizaciones disponibles de VH y VL presentes en la muestra de ácidos nucleicos de inmunocitos, por ejemplo, como se describe en el método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de la PCR como una marca en un extremo, según se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante una nueva amplificación de la PCR con un cebador marcado, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

A partir de segmentos de genes V *in vitro* se pueden derivar repertorios de genes V sintéticamente reorganizados. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (según Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y mapeados (explicados en Matsuda *et al.*, *Nature Genét.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluidos todas las principales conformaciones del bucle H1 y H2) se pueden utilizar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de la PCR que codifican bucles de H3 de secuencia y longitud diversas, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden preparar con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle de H3 largo de una única longitud, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de V κ y V λ humanos se han clonado y secuenciado (explicado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para preparar repertorios sintéticos de la cadena ligera. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gran variedad de dominios de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación de los ADN codificadores de genes V, los segmentos de genes V de línea germinal se pueden reorganizar *in vitro* según los métodos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos mediante combinación de repertorios de genes de VH y VL juntos de varias formas. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266

220

(1993). El procedimiento de la recombinación *in vivo* se aprovecha de las dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL vírgenes se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector fágico. A continuación, se combinan las dos bibliotecas mediante infección fágica de bacterias que contienen fagémidos, de forma que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca sólo está limitado por el número de células presente (unos 10^{12} clones). Los dos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*, por lo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se introducen en viriones fágicos. Estas enormes librerías proporcionan gran número de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

Alternativamente, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblar juntos mediante PCR y, luego, clonarlos, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje de la PCR también se puede utilizar para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena única (scFv). En otra técnica, "el ensamblaje de la PCR en el interior de la célula" se usa para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y, luego, clonar repertorios de genes enlazados, como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por librerías vírgenes (bien naturales bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* mediante construcción y reselección a partir de librerías secundarias, como se describe en Winter *et al.* (1994), citado anteriormente. Por ejemplo, la mutación se puede introducir aleatoriamente *in vitro* utilizando polimerasa con tendencia al error (explicado en Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Asimismo, la maduración de la afinidad se puede realizar mediante mutación aleatorizada de una o más CDR, por ejemplo, utilizando PCR con cebadores de secuencia aleatoria que abarquen la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados, y detecten clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describía un procedimiento para inducir la mutagenia en una región de determinación de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulinas para crear una librería de genes de la cadena ligera. Otro método eficaz consiste en recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por representación en fagos con repertorios de variantes de dominio V que se producen naturalmente obtenidos a partir de donantes no inmunizados y detectar los de mayor afinidad en varias series de nueva transposición de cadenas, como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades del orden de 10^{-9} M.

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de DLL4 son bien conocidos en el sector. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la DLL4 se puede diseñar usando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de DLL4. Alternativamente, se puede utilizar la secuencia de ADNc (o fragmentos de estas) de GenBank Accession Núms. NM_019074. DLL4 es una proteína transmembrana. La región extracelular contiene 8 repeticiones del gen EGF-like, así como un dominio DSL que se conserva entre todos los ligandos de Notch y es necesario para la unión al receptor. La proteína prevista también contiene una región transmembrana y una cola citoplásmica que carece de motivos catalíticos. La proteína DLL4 humana es una proteína de 685 aminoácidos que contiene las regiones

siguientes: péptido de señal (aminoácidos 1-25); MNNL (aminoácidos 26-92); DSL (aminoácidos 155-217); EGF-Like (aminoácidos 221-251); EGF-Like (aminoácidos 252-282); EGF-Like (aminoácidos 284-322); EGF-Like (aminoácidos 324-360); EGF-Like (aminoácidos 366-400); EGF-Like (aminoácidos 402-438); EGF-Like (aminoácidos 440-476); EGF-Like (aminoácidos 480-518); transmembrana (aminoácidos 529-551); dominio citoplásmico (aminoácidos 552-685). El número de entrada de la DLL4 humana es NM_019074 y el número de entrada de la DLL4 murina es NM_019454.

Los ADN que codifican la DLL4 se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en el sector. Estos métodos incluyen la síntesis química mediante cualquiera de los métodos descritos en Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**: 716-734 (1989), como los métodos de triéster, fosfito, fosforamidita y H-fosfonato. En una forma de realización, los codones preferidos por la expresión de células huésped se usan en el diseño de la DLL4 que codifica ADN. Otra alternativa es aislar el ADN que codifica la DLL4 a partir de una librería de ADNc o genómica.

Tras la construcción de la molécula de ADN que codifica la DLL4, la molécula de ADN se enlaza funcionalmente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, como un plásmido, en la que la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plásmidos contienen secuencias de control y replicación que se derivan de especies compatibles con la célula huésped. Por lo general, el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Los vectores aptos para la expresión en células huésped procarióticas y eucarióticas son bien conocidos en la materia y algunos se describen con mayor detalle en la presente memoria descriptiva. Se pueden usar organismos eucarióticos, como las levaduras, o células derivadas de organismos pluricelulares, como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica la DLL4 se enlaza funcionalmente a una secuencia líder secretora, lo que origina la secreción del producto de expresión por la célula huésped en el medio de cultivo. Ejemplos de secuencias líder secretoras son stII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es apta para su uso en la presente memoria descriptiva la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, **4**: 3901 (1985)).

Las células huésped son transfectadas y preferiblemente transformadas con los vectores de expresión o clonación de esta invención y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Por transfección se entiende la captación de un vector de expresión por una célula huésped, con independencia de que estén expresadas realmente secuencias de codificación. Normalmente, los expertos conocen numerosos métodos de transfección, como por ejemplo, precipitación y electroporación de CaPO_4 . Por lo general, se reconoce que se ha logrado la transfección cuando se produce una indicación del funcionamiento de este vector dentro de la célula huésped. Los métodos de transfección son bien conocidos en la materia y algunos se describen con mayor detalle en la presente memoria descriptiva.

La transformación supone introducir ADN en un organismo de forma que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. En función de la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. Los métodos de

transformación son bien conocidos en la materia y algunos se describen con mayor detalle en la presente memoria descriptiva.

Las células huésped procarióticas usadas para producir la DLL4 se pueden cultivar como se describe en términos generales en Sambrook *et al.*, como se indica anteriormente.

5 Las células huésped en mamíferos usadas para producir la DLL4 se pueden cultivar en diversos medios, que son bien conocidos en el sector y algunos de los cuales se describen en la presente memoria descriptiva.

Las células huésped mencionadas en esta memoria engloban células en cultivo *in vitro*, así como células que están dentro de un animal huésped.

10 La purificación de DLL4 se puede lograr utilizando métodos reconocidos en este ámbito, algunos de los cuales se describen en esta memoria descriptiva.

La DLL4 purificada se puede unir a una matriz adecuada como partículas de agarosa, partículas de acrilamida, partículas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de metacrilato de hidróxilo, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nailon, moléculas vehículo neutras e iónicas y similares, para uso en la separación mediante cromatografía de afinidad de clones de representación en fagos. La unión de la proteína DLL4 a
15 la matriz se puede conseguir mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica comúnmente empleada para unir ligandos de proteínas a matrices de polisacáridos, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, supone la activación de la molécula vehículo con halidos cianógenos y el acoplamiento subsiguiente de las aminas primarias alifáticas o aromáticas del ligando peptídico a la matriz activada.

Alternativamente, la DLL4 se puede utilizar para revestir los pocillos de placas de adsorción, expresada en
20 anfitriones celulares en placas de adsorción o utilizada en separación celular, o conjugada con biotina para captura con partículas revestidas de estreptavidina, o utilizadas en cualquier otro procedimiento conocido en el sector para detectar librerías de representación en fagos.

Las muestras de librerías de fagos están en contacto con DLL4 inmovilizada en condiciones aptas para la unión de al menos una porción de partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluido el
25 pH, la concentración iónica, la temperatura y similares, se seleccionan de forma que imiten condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, luego, se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición antigénica con DLL4, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición antigénica de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).
30 Los fagos se pueden enriquecer de 20 a 1.000 veces en una única serie de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivos bacterianos y estar sometidos a nuevas series de selección.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluida la cinética de la disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpos de un único fago se pueden unir simultáneamente a antígeno. Los anticuerpos con rápida cinética de disociación (y afinidades de unión débiles) se pueden conservar mediante el uso de
35 lavados cortos, representación en fagos multivalentes y densidad de revestimiento alta del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza al fago durante las interacciones multivalentes, sino que, además, favorece que se vuelva a producir la unión del fago disociado. La selección de anticuerpos con cinética lenta de disociación (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de largos lavados y representación en fagos

monovalentes, como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de distintas afinidades, incluso con afinidades que difirieren ligeramente, para DLL4. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como la realizada en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad descritas anteriormente) es probable que ocasione muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y unos cuantos con afinidad más alta. Con una DLL4 limitada, es raro que se pudieran completar fagos de alta afinidad. Para conservar todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con una cantidad mayor de DLL4 biotinilada, pero con la DLL4 biotinilada a una concentración de molaridad inferior a la constante de afinidad molar diana para DLL4. Los fagos con afinidad de unión más alta pueden, entonces, ser capturados por partículas paramagnéticas revestidas de estreptavidina. Esta "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permita aislar clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más elevada que la enorme cantidad de fagos con afinidad menor. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para distinguirlos en función de la cinética de disociación.

Los clones anti-DLL4 se pueden seleccionar por actividad. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-DLL4 que bloquean la unión entre un receptor Notch (como Notch 1, Notch 2, Notch 3 y/o Notch 4) y DLL4, pero no bloquean la unión entre un receptor Notch y una segunda proteína. Los clones de Fv que corresponden a estos anticuerpos anti-DLL4 se pueden seleccionar (1) aislando clones anti-DLL4 de una librería de fagos como se ha descrito antes y, opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fagos cultivando la población en un anfitrión bacteriano apropiado; (2) seleccionando DLL4 y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti-DLL4 a DLL4 inmovilizada; (4) usando una mayor cantidad de la segunda proteína para eluir los clones no descados que reconocen los determinantes de unión a DLL4 que se solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que no se han adsorbido aún tras el paso (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes descadas se pueden enriquecer también mediante repetición de los procedimientos de selección descritos en la presente memoria descriptiva una o más veces.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv de la invención es rápidamente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleóticos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de plantillas de ADN de fagos o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células anfitrión, como por ejemplo las células E. coli, las células COS de monos, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que, de otro modo, no producen la proteína de la inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrión recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención se pueden combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de la cadena ligera y/o la cadena pesada (por ejemplo, las secuencias

de ADN apropiadas se pueden obtener según Kabat et al., como se ha descrito anteriormente) para formar clones que codifiquen cadenas ligeras y/o pesadas de longitud total o parcial. Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isotipo se pueden utilizar para este fin, incluidas las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie animal o humana. Un clon de Fv se deriva del ADN del dominio variable de una especie animal (por ejemplo, un humano) y, luego, se fusiona al ADN de la región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias de codificación, puesto que una cadena ligera y/o pesada de longitud completa e "híbrida" está incluida en la definición de anticuerpo "híbrido" y "quimérico" como se usa en la presente memoria descriptiva. En una forma de realización preferente, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humano para formar una o más secuencias de codificación para todas las cadenas ligeras y/o pesadas de longitud parcial o completa y humanas.

El ADN que codifica un anticuerpo anti-DLL4 derivado de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma por la secuencia de codificación para los dominios constantes de la cadena ligera y pesada humanas (por ejemplo, como en el método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado del clon de Fv o un hibridoma se puede modificar a su vez mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tiene la especificidad de unión de los anticuerpos de la invención derivados del clon de hibridoma o del clon de Fv.

Fragmentos de anticuerpos

La presente invención engloba fragmentos de anticuerpos. En determinadas circunstancias, existen ventajas en el uso de fragmentos de anticuerpos, en vez de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación y puede llevar a un mejor acceso a tumores sólidos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en *E. coli* y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se puede recuperar directamente de *E. coli* y se pueden unir químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro método, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con mayor semivida *in vivo* que comprende residuos de un epítipo de unión a un receptor de rescate se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Los expertos en este campo conocerán otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE.UU. n.º 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están privados de regiones constantes; por ello, son aptos para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión sFv para obtener la

fusión de una proteína efectora en el extremo carboxi terminal o amino terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal y como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.641.870. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5 **Anticuerpos humanizados**

La presente invención engloba anticuerpos humanizados. En el sector se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo desde una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen a menudo como residuos "importados", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colaboradores (Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.*, (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n.º 4.816.567) donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de especies no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que los residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán para obtener los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la biblioteca conocida de secuencias de dominio variable de humanos. La secuencia humana que se parece más a la del roedor se acepta, entonces, como la estructura humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro procedimiento utiliza una estructura concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de las cadenas ligera o pesada. Esta misma estructura se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.*, (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la afinidad alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo uno de los métodos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y las humanizadas. Generalmente se dispone de modelos de inmunoglobina tridimensional conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel que es probable que desempeñen los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad por el

antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable intervienen de forma más directa y sustancial en la influencia sobre la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos anti-DLL4 de la invención se pueden construir combinando una o más secuencias del dominio variable Fv de clones seleccionadas de librerías de representación en fagos derivados de humanos con una o más secuencias del dominio constante humanas, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos humanos monoclonales anti-DLL4 de la invención se pueden producir por el método del hibridoma. Las estirpes celulares del mieloma humano y del heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, en Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no se produzca inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la región del gen (JH) en ratones quiméricos y en líneas germinales de ratones mutantes ocasiona la inhibición total de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes humanos de la inmunoglobulina de línea germinal en uno de estos ratones mutantes de línea germinal ocasionará la producción de anticuerpos humanos al actuar sobre el antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También se puede utilizar la transposición de genes para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de inicio. Según este método, que también se denomina "impronta de epítomos", la región variable de la cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de representación en fagos como las descritas anteriormente se sustituye por un repertorio de genes de dominio V humanos, lo que crea una población de quimeras Fab o scFv de cadena humana/cadena no humana. La selección con el antígeno da lugar al aislamiento de un Fab o scFV quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente del clon primario de la representación en fagos; es decir, el epítipo rige (sella) la elección de la molécula de la cadena humana. Cuando se repite el proceso para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la tradicional humanización de anticuerpos no humanos mediante trasplante de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen residuos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión con al menos dos antígenos diferentes. En el caso que nos ocupa, una de las especificidades de unión corresponde a DLL4 y la otra, a cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítomos diferentes de la proteína DLL4. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan DLL4. Estos anticuerpos tienen un

brazo de unión a DLL4 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ej., saporin, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

5 Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción recombinante tradicional de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen distintas especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

15 Según una técnica distinta y que se suele preferir, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan a un organismo huésped adecuado. Esto permite una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en formas de realización cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de, al menos, dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales da lugar a rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

20 En una forma de realización preferente de este método, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona una forma sencilla de separación. Este método se describe en el documento WO 94/04690. Para obtener más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

35 Según otro método, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfaz preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con

cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales largas se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar la producción del heterodímero con respecto a otros productos
5 finales no deseados como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulantes o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede unir a la avidina y el otro a la biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para conseguir que las células del sistema inmunitario actúen sobre células no deseadas (patente de EE.UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360 y WO
10 92/00373 y la patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener utilizando cualquier método de reticulación adecuado. Los agentes reticulantes adecuados se conocen bien en la materia y se describen en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar mediante un enlace
15 químico. Brennan *et al.*, *Science*, **229**: 81 (1985) describe un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB se reconvierte entonces en Fab'-tiol por reducción con
20 mercaptoetilanina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Descubrimientos actuales han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden unir químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, **175**: 217-225 (1992)
25 describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')₂ completamente humanizado. Cada uno de los fragmentos Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a la unión química dirigida *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico formado era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y las células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, **148**(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros
35 y, después, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio

variable de la cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento tienen que aparearse con los dominios complementarios VL y VH de otro fragmento, formando, por lo tanto, dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, **152**:5368 (1994).

También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* **147**: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) con mayor rapidez que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio preferente de dimerización comprende una región Fc o una región bisagra o está formado por ellas. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminal a la región Fe. El anticuerpo multivalente preferente en la presente memoria descriptiva comprende entre tres y ocho sitios de unión al antígeno aproximadamente, aunque preferentemente cuatro, o está formado por esos sitios. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (y preferentemente dos cadenas de polipéptidos), en el cual la cadena o cadenas de polipéptidos comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender VD1-(X1)*n*-VD2-(X2)*n*-Fc, donde VD1 es un primer dominio de variable, VD2 es un segundo dominio de variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y *n* es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1- cadena de la región Fc o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva comprende, además, preferentemente, al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, puede comprender entre dos y cuatro polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera considerados en esta memoria descriptiva comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, un dominio CL.

Variantes de anticuerpos

En algunas formas de realización se contemplan la(s) modificación(es) de la secuencia de aminoácidos descritas en la presente memoria. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar al introducir cambios nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis del péptido. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de las secuencias del aminoácido del anticuerpo y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las mismas. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar al constructo final, siempre que dicho constructo tenga las características deseadas.

Las alteraciones aminoacídicas pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se prepara la secuencia.

Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagenia se denomina "mutagenia de barrido de alanina", tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En la presente memoria descriptiva, se identifica un residuo o grupo de residuos de dianas (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido con carga negativa o neutra (preferentemente, alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas localizaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en los sitios de sustitución. Por tanto, a pesar de que el sitio donde introducir una variación de una secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación per se tenga un carácter predeterminado. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un lugar dado, se realiza el barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se monitorizan para detectar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxi terminal que abarcan desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil en el extremo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida sérica del anticuerpo.

La glicosilación de los polipéptidos se realiza generalmente por enlace N u O. Por enlace tipo N se entiende el anclaje del residuo glucídico en la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para los anclajes enzimáticos del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un lugar de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace tipo O se refiere al anclaje de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente al alterar la secuencia del aminoácido para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descrita(s) anteriormente (para lugares de glicosilación unidos por enlace tipo N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para lugares de glicosilación unidos por enlace tipo O).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la Solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et

al., y en la Patente de Estados Unidos n.º 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a los anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

En la presente memoria descriptiva, la variante de glicosilación preferente comprende una región Fc, en la que una estructura de carbohidratos anexa a la región Fc carece de fucosa. Estas variantes han mejorado la función de la ADCC. Opcionalmente, la región Fc también comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la zona que mejora aún más la ADCC; por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Entre las publicaciones relacionadas con los anticuerpos "defucosilados" o "con déficit de fucosa" podríamos citar: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados encontraríamos las células Lec13 CHO con déficit de fucosilación de proteínas (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la Solicitud de Patente de EE.UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente el ejemplo 11) y las líneas celulares bloqueadas, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, el *FUT8* y células CHO bloqueadas (Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes reemplazan al menos un residuo de aminoácidos en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los lugares de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1, en la columna "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces los productos se pueden examinar y se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lis; Gln; Asn	Lis
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lis; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp

Gli (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lis; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Fe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Fe	Ile
Lis (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Fe; Ile	Leu
Fe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tir	Tir
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Tr	Tr
Tr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tir; Fe	Tir
Tir (Y)	Trp; Fe; Tr; Ser	Fe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Fe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la base del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar diana, o (c) el residuo de la cadena lateral. Los residuos que aparecen de forma natural se dividen en grupos sobre la base de las propiedades comunes de sus cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutrales: Cis, Ser, Tr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: his, lys, arg;
- (5) residuos que tiene influencia en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para mayor desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental desde el cual se generaron. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada

sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se representan a partir de partículas de fagos filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13 dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se monitorizan para detectar su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se describe en esta memoria descriptiva. Para identificar los lugares de la región hipervariable candidatos para la modificación, se pueden realizar barridos de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión del antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a monitorización, tal como se describe en la presente memoria descriptiva y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para mayor desarrollo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos presentes en la naturaleza) o preparación mediante mutagénesis con mediación oligonucleótida (o controlada *in situ*), mutagénesis PCR, y mutagénesis de módulo de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones en los aminoácidos en la región Fc de polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, lo que genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas) que contenga una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluida la de la cisteína bisagra. Según esta descripción y los conocimientos del sector, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo usado en los métodos de la invención pueda comprender una o más alteraciones, frente a su anticuerpo homólogo de tipo natural, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservarán las mismas características necesarias para uso terapéutico, frente a su homólogo de tipo natural. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar algunas alteraciones en la región Fc que daría como resultado la unión C1q alterada y/o en Citotoxicidad Dependiente de Complementos (CDC), por ejemplo, como se describe en WO99/51642. Véase también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); Patente de EE.UU. n.º 5.648.260; Patente de EE.UU. n.º 5.624.821; y WO94/29351 que tratan otros ejemplos de variantes de regiones Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcR mejoradas o disminuidas. El contenido de estas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con un aumento de su semivida y una unión mejorada al receptor neonatal Fc (FcRn), que es responsable de la transmisión de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la zona que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoácidas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.194.551B1 y el documento

WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Derivados del anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse aún más a fin de que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en la materia y se encuentran disponibles. Preferiblemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de los polímeros solubles en agua incluyen los siguientes componentes: polietilenglicol (PEG), copolímero de etilenglicol / propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, óxido de prolipropileno / copolímeros de óxido de etileno, polialcoholes polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehído ofrezca ventajas en la elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no. La cantidad de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Generalmente, la cantidad y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización pueden determinarse en función de ciertas consideraciones, como las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el anticuerpo derivatizado será utilizado en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

Detección de anticuerpos con las propiedades deseadas

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físico-químicas y por sus funciones biológicas mediante varios ensayos conocidos en el sector. En algunas formas de realización, los anticuerpos están caracterizados por uno o más sitios de unión a DLL4; y/o reducción o bloqueo de la activación del receptor Notch; y/o reducción o bloqueo de la señalización molecular en el extremo 3' del receptor Notch; y/o alteración o bloqueo de la unión del receptor Notch a DLL4; y/o promoción de la proliferación de células endoteliales; y/o inhibición de la diferenciación de células endoteliales; y/o inhibición de la diferenciación arterial; y/o inhibición de la perfusión vascular de tumores; y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno de la proliferación celular o cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de DLL4; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad del receptor Notch.

Asimismo, los anticuerpos purificados se pueden caracterizar mediante una serie de ensayos que incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta resolución no desnaturante de exclusión por tamaño (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En ciertas formas de realización de la invención se analiza la actividad biológica de los anticuerpos producidos en la misma. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se prueban por su actividad de unión al antígeno. Los ensayos de unión al antígeno que se conocen en la especialidad y pueden ser usados en la presente memoria descriptiva incluyen ensayos de unión competitiva o directa que usan técnicas como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática), inmunoanálisis de doble anticuerpo (tipo "sandwich"), ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Los ensayos de unión a antígeno ilustrativos se incluyen más adelante en la sección Ejemplos.

En otra forma de realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-DLL4 que compiten con anticuerpo 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 y/o 26.82 para unión a DLL4. Estos anticuerpos competidores incluyen anticuerpos que reconocen un epítipo de DLL4 que es el mismo o se superpone con el epítipo de DLL4 reconocido por el anticuerpo 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 y/o 26.82. Estos anticuerpos competidores se pueden obtener mediante
5 detección de sobrenadantes de hibridoma anti-DLL4 para unión a DLL4 inmovilizada en competencia con anticuerpo marcado 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 y/o 26.82. Un sobrenadante de hibridoma que contenga un anticuerpo competidor reducirá la cantidad de anticuerpo marcado unido detectado en la mezcla de unión de competición en el sujeto, frente a la cantidad de anticuerpo marcado unido detectada en una mezcla de unión a control que contenga un anticuerpo no pertinente (o ningún anticuerpo). Cualquiera de los ensayos de unión por competición descritos en la presente
10 memoria descriptiva es apto para uso en el procedimiento siguiente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-DLL4 que comprende una o más HVR (como 2, 3, 4, 5 y/o 6) de un anticuerpo 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 y/o 26.82. Un anticuerpo monoclonal anti-DLL4 que comprende una o más HVR de 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 y/o 26.82 se puede construir mediante trasplante de una o más HVR de 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 y/o 26.82 en una secuencia de anticuerpos plantilla, por ejemplo, una
15 secuencia de anticuerpos humanos que está próxima a la secuencia murina correspondiente del anticuerpo parenteral, o una secuencia de consenso de todos los anticuerpos humano en el subgrupo concreto de la cadena pesada o ligera del anticuerpo parental y que exprese la o las secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o ligera quimérica, con o sin secuencia o secuencias de la región constante, en células huésped recombinantes, como se describe en la presente memoria descriptiva.

Los anticuerpos anti-DLL4 de la invención que tengan las propiedades únicas descritas en esta memoria descriptiva se pueden obtener mediante detección de clones de hibridoma anti-DLL4 para las propiedades deseadas mediante un método cómodo. Por ejemplo, si se desea un anticuerpo monoclonal anti-DLL4 que bloquee o no bloquee la unión de receptores Notch a DLL4, el anticuerpo candidato se puede probar en un ensayo de competición de unión, como un ensayo ELISA de unión competitiva, donde los pocillos de las placas están revestidos con DLL4,
20 y una solución de anticuerpo en un exceso del receptor Notch de interés se deposita en las placas revestidas, y el anticuerpo unido se detecta enzimáticamente, por ejemplo, mediante contacto del anticuerpo unido al anticuerpo anti-Ig conjugado con HRP o anticuerpo anti-Ig biotinilado y desarrollo de reacción de coloración de HRP, por ejemplo, mediante desarrollo de placas con HRP de estreptavidina y/o peróxido de hidrógeno y detección de la reacción de coloración de HRP mediante espectrometría a 490 nm con un lector de placas ELISA.

En una forma de realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que tiene algunas, pero no la totalidad, de las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo in vivo es importante, pero determinadas funciones efectoras (como complemento y ADCC) son innecesarias o dañinas. En algunas formas de realización, se miden las actividades Fc de la
30 inmunoglobulina producida para garantizar que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* para confirmar la reducción/depleción de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) pueden ser realizados para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por eso es probable que carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo Fc(RIII, mientras que los monocitos

expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol*, 9:457-92 (1991). En las patentes de EE.UU. Nº 5.500.362 ó 5.821.337 se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y las células asesinas (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.A*, 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo los ensayos de unión C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse al C1q y por ello carece de actividad CDC. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como, por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). También se pueden realizar la unión de FcRn y eliminación *in vivo*/determinaciones de semivida con el uso de métodos conocidos en este ámbito; por ejemplo, los descritos en la sección Ejemplos.

Vectores, células huésped y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleótidas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte del huésped celular que se utilice. Por lo general, las células huésped preferidas son de origen procariótico o eucariótico (en general, de mamíferos). Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isotipo se pueden utilizar para este fin, incluidas las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie animal o humana.

a. Generación de anticuerpos usando células huésped eucarióticas

i. Construcción de vectores

Las secuencias de polinucleótidos que codifiquen componentes de polipéptidos del anticuerpo de la invención se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias deseadas de polinucleótidos se pueden aislar y secuenciar a partir de anticuerpos que producen células, como por ejemplo células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar usando técnicas de PCR o sintetizador de nucleótidos. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en los huéspedes procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden utilizar para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y de la célula huésped concreta que se transformará con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo o ambas) y su compatibilidad con la célula huésped concreta en la que resida. Los componentes del vector incluyen, por lo general: un origen de replicación, un gen marcador de la selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia de señal, la inserción del ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en conexión con estos huéspedes. Por lo general, el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias de marcado, que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli*. El pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporcionan una forma fácil de identificar células transformadas. El pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener también, o ser modificados para que contengan, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados del pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., Patente de EE.UU. n.º 5.648.237.

Además, los vectores fágicos que contienen secuencias de control y replicón que son compatibles con los microorganismos huésped se pueden usar como vectores de transformación en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, un bacteriófago como λ GEM™-11 se puede utilizar para marcar un vector recombinante que se pueda utilizar para transformar células huésped susceptibles como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotores de cistron, que codifiquen cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada antes del extremo 5' del promotor en un cistron que modula su expresión. Los promotores procarióticos suelen pertenecer a dos clases: inducibles y constitutivos. El promotor inducible es aquel que inicia un aumento de los niveles de transcripción del cistron bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conoce un gran número de promotores reconocidos por diversas células huésped posibles. El promotor seleccionado puede ser funcionalmente enlazado al ADN del cistron que codifica la cadena pesada o ligera mediante eliminación del promotor del ADN fuente a través de digestión enzimática mediante restricción e inserción de la secuencia aislada del promotor en el vector de la invención. Tanto la secuencia nativa del promotor como muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, puesto que por lo general permiten una mayor transcripción y una mayor producción del gen diana expresado, frente al promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores aptos para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de lactosa y β -galactamasa, un sistema promotor a base de triptofano (*trp*) y promotores híbridos como el promotor *tac* o el *trc*. Sin embargo, también son aptos otros promotores que son funcionales en bacterias (como otros promotores de fagos o bacterianos conocidos). Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, lo que permite que un experto pueda ligarlas a cistrones que codifiquen las cadenas pesada y ligera dianas (Siebenlist et al., (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazadores o adaptadores que proporcionen sitios de restricción necesarios.

En un aspecto de la invención, cada cistron dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señal de la secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados en una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada a efectos de esta invención es aquella que la célula huésped reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señal). Para las células huésped procarióticas

que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal es sustituida por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, entre un grupo formado por fosfatasa alcalina, penicilasa, Ipp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias de señal usadas en los dos cistrones del sistema de expresión son

5 secuencias de señal STII o variantes de ellas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistron. A este respecto, las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se expresan, multiplican y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas de huéspedes (por ejemplo,

10 las cepas de *E. coli* trxB) ofrecen condiciones citoplasmáticas que son favorables a la formación de uniones de disulfuros, lo que permite una multiplicación y ensamblaje correctos de las subunidades de las proteínas expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Las células huésped procarióticas aptas para la expresión de anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, como microorganismos grampositivos o gramnegativos. Entre los ejemplos de

15 bacterias útiles se incluyen Escherichia (por ejemplo, *E. coli*), Bacilli (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, las especies Pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla o Paracoccus. En una forma de realización, se utilizan células gramnegativas. En una forma de realización, se utilizan células *E. coli* como huéspedes para la invención. Entre los ejemplos de cepas *E. coli* están W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; ATCC® Depósito N.º 27,325) y derivados de las

20 mismas, que comprenden la cepa 33D3 con el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de EE.UU. n.º. 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308(ATCC 31.608) también están indicados. Estos ejemplos tienen un carácter ilustrativo y no limitador. Los métodos para construcción de derivados de

25 cualquiera de las bacterias antes mencionadas con genotipos definidos son conocidos en el sector y se describen, por ejemplo, en Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Por lo general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, Serratia o Salmonella se pueden usar bien como huésped cuando plásmidos bien conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 se utilizan para suministrar al replicón. Normalmente, en caso de que la célula huésped deba

30 secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas puede resultar conveniente incorporar al cultivo celular inhibidores adicionales de la proteasa.

ii. Producción de anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar

35 transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el huésped procariótico de forma que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. En función de la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con

calcio que emplea cloruro de calcio se usa por lo general para células bacterianas que contienen barreras sustanciales en la pared celular. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada es la electroporación.

Las células procarióticas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en el sector y aptos para el cultivo de células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios apropiados son caldo de luria (LB) más nutrientes suplementarios necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, elegido en función de la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de células procarióticas que contengan el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios de cultivo para el crecimiento de células que expresan un gen resistente a ampicilina.

Los anticuerpos necesarios aparte de carbono, nitrógeno y fuentes inorgánicas de fosfato también se pueden incluir a concentraciones apropiadas introducidas solas en una mezcla con otro suplemento o medio de cultivo como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados a partir del grupo formado por glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditioneitol.

Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. El crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, se produce a un rango de temperaturas comprendido entre unos 20 °C y unos 39 °C; mejor aún, entre unos 25 °C y unos 37 °C; y, aún mejor, a unos 30 °C. El pH del medio de cultivo puede ser cualquiera comprendido entre 5 y 9 aproximadamente, dependiendo sobre todo del microorganismo huésped. El pH para *E. coli* oscila, preferiblemente entre 6,8 y 7,4 aproximadamente, y mejor aún si es de 7,0.

Si un promotor inducible se utiliza en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce en condiciones aptas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Según esto, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitador de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio de cultivo limitador de fosfato es el C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se pueden utilizar otros inductores diversos, según el constructo de vector empleado, como se sabe en el sector.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células huésped y se recuperan allí. La recuperación de las proteínas supone la ruptura de los microorganismos, por lo general mediante choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez producida la ruptura de las células, los desechos celulares o células enteras se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse más, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con resina. De manera alternativa, pueden transportarse proteínas dentro del medio de cultivo y aislarse en él. Las células pueden retirarse del cultivo, y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para proceder a la posterior purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden volver a aislarse e identificarse mediante métodos comunes conocidos, como la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y ensayos Western blot.

En uno de los aspectos de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante proceso de fermentación. Existen varios procesos disponibles de fermentación de lotes alimentados a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala se realizan en dispositivos de al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente, entre 1.000 y 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan agitadores de hélice para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferente de

carbono/energía). La fermentación a pequeña escala hace referencia generalmente a la fermentación en fermentadores de aproximadamente no más de 100 litros de capacidad volumétrica, y pueden variar de 1 a 100 litros aproximadamente.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión proteica se inicia típicamente después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta alcanzar la densidad deseada, por ejemplo una OD₅₅₀ de entre 180-220, momento en el cual las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse distintos inductores, de acuerdo con el constructo del vector utilizado, tal y como se conoce en la materia y como se ha descrito anteriormente. Las células pueden hacerse crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante unas 12-50 horas, aunque es posible utilizar tiempos de inducción más cortos o más prolongados.

Pueden modificarse distintas condiciones de fermentación para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje adecuado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresan la proteína chaperona, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidil-propil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células huésped procarióticas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan la solubilidad y el plegamiento adecuado de las proteínas heterólogas producidas en células bacteriales huésped. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de EE.UU. n.º 6,083,715; Georgiou et al., Patente de EE.UU. n.º 6,027,888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al., (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Pueden utilizarse ciertas cepas huésped con deficiencia de enzimas proteolíticas para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas (especialmente las que son sensibles desde el punto de vista proteolítico). Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas relativas a los genes que codifican proteasas bacteriales conocidas, como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de éstas. Algunas cepas de *E. coli* con deficiencia de proteasas están disponibles, y descritas, por ejemplo en Joly et al., (1998), citado anteriormente; Georgiou et al., Patente de EE.UU. n.º 5.264.365; Georgiou et al., Patente de EE.UU. n.º 5.508.192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una forma de realización, en el sistema de expresión de la invención se utilizan como células huésped cepas de *E. coli* con deficiencia de enzimas proteolíticas transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

iii. Purificación de anticuerpos

Pueden emplearse métodos estándar conocidas en la materia para la purificación de proteínas. Los siguientes procedimientos tienen carácter ejemplar en lo que se refiere a procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de intercambio iónico o de inmunoadfinidad, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en anhídrido silícico o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación en sulfato de amonio y filtrado en gel mediante, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se utiliza Proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpos de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular de 41kD del *Staphylococcus aureus* que se une con gran afinidad por la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al., (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida a la que se fija la Proteína A es preferiblemente una columna que
5 contenga una superficie de vidrio o anhídrido silícico, o, aún mejor, una columna de ácido silícico o de vidrio poroso controlado. En algunas aplicaciones, la columna ha sido recubierta con un reactivo, como el glicerol, para evitar una posible adherencia inespecífica de contaminantes.

Como primer paso de purificación, la preparación derivada del cultivo celular, según lo descrito anteriormente, se aplica a la fase sólida de Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo
10 de interés a la Proteína A. A continuación, se procede a lavar la fase sólida para eliminar los contaminantes unidos inespecíficamente a ella. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

b. Generación de anticuerpos usando células huésped eucarióticas

Los componentes del vector suelen incluir, entre otros, uno o más de los siguientes elementos: una
15 secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción.

(i) Componente de secuencia de la señal

Un vector para uso en una célula huésped eucariótica puede contener también una secuencia de señal u otro polipéptido con una escisión específica en el término N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal
20 heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que la célula huésped reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señal). En la expresión celular de los mamíferos, están disponibles las secuencias de señal de los mamíferos así como los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal del herpes simplex gD.

El ADN para la región de dicho precursor está ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de la replicación

25 Por lo general, no es necesario un componente origen de la replicación para los vectores de expresión en mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor precoz.

(iii) Componente gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras
30 toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, si procede o (c) suministran nutrientes básicos no disponibles a partir de medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Estas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que otorga
35 resistencia al fármaco y, así, sobrevive a la estrategia de selección. Ejemplos de esta selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células encargadas de absorber el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina cinasa,

metalotioneína I y II, preferiblemente, genes de metalotioneína en primates, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero a través del cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se utiliza el DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad del DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células huésped (en especial los huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable como la aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. N° 4.965.199.

(iv) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está funcionalmente enlazado al ácido nucleico del polipéptido del anticuerpo. Se conocen las secuencias de promotores para eucariotas. Prácticamente todos los genes aleucarióticos tienen una región rica en AT situada aproximadamente entre las bases 25 y 30 antes del extremo 5' del promotor desde el sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada entre las bases 70 y 80 antes del extremo 5' del promotor desde el inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido (identificador de secuencia n.º: 60). En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli(A) al extremo 3' de la secuencia de codificación (identificador de secuencia n.º: 61). Todas estas secuencias se insertan bien en los vectores de expresión eucariótica.

La transcripción del polipéptido de anticuerpos a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el poliomavirus, el virus de la viruela de las aves de corral, el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviario, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el Simian Virus 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen fácilmente como un fragmento de restricción del SV40, que también contiene el origen viral de replicación del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene fácilmente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para la expresión del ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la patente de EE.UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.601.978. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

(v) *Componente elemento potenciador*

La transcripción de ADN que codifique el polipéptido del anticuerpo de esta invención a través de eucariotas más altas se aumenta con frecuencia al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Se conocen ya muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína alfa e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Entre los ejemplos destacan el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) para elementos de potenciación para la activación de los promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de codificación del polipéptido del anticuerpo, pero está situado preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) *Componente finalización de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucarióticas contendrán también, por lo general, secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 5', y ocasionalmente el 3', de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de finalización de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se da a conocer en el mismo.

(vii) *Selección y transformación de células huésped*

Entre las células huésped apropiadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva figuran las células eucariotas más altas, incluidas las células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón del mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 ó 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (WI38, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células huésped

Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercialmente disponibles como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios de cultivo descritos en Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Patentes de EE.UU. n.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Ref. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar cuando sea necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes por lo habitual en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se pueden incluir también otros suplementos necesarios a concentraciones adecuadas que serán conocidas por aquellos con conocimientos en la materia. Las condiciones del cultivo, como temperatura o pH entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para expresión y serán conocidas por los expertos en la materia.

(ix) Purificación del anticuerpo

Al utilizar técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo intracelularmente o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los residuos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero, por lo general, utilizando un filtro para concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon®. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF en cualquiera de las fases anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. Esta última es la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une es con frecuencia la más agarosa, pero también están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estireno-divinil)benceno, permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey) es útil para la purificación. También están disponibles, dependiendo del anticuerpo que quiera recuperarse, otras técnicas para la purificación de las proteínas, como fraccionamiento en una

columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en anhídrido silícico, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio iónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatoisoelectroforesis, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

5 Siguiendo cualquiera de las fases preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes puede estar sujeta a cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo utilizando una solución de elución a un pH entre 2,5 y 4,5, preferiblemente a concentraciones bajas en sal (por ejemplo, entre 0-0,25 M aproximadamente).

Immunoconjugados

10 La invención también proporciona immunoconjugados (también denominados "conjugados de anticuerpos con fármacos" o "ADC"), que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-DLL4 descritos en la presente memoria descriptiva conjugado a un agente citotóxico como por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

15 El uso de conjugados de anticuerpos con fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE. UU. n.º 4.975.278), permite la administración del grupo de fármacos a tumores y una acumulación intracelular en éstos, donde la administración sistemática de estos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como para las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* págs. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al., (eds), págs. 475-506). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los medicamentos empleados en 25 estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland et al., (1986) mencionado anteriormente). Entre las toxinas empleadas en los conjugados de anticuerpos con toxinas se encuentran toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de molécula pequeña como la geldanamicina (Mandler et al., (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), 30 maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

35 ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idex) es un anticuerpo conjugado con un radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B cancerosos y normales, y contra el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un quelante enlazador de tiourea (Wiseman et al., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al., (2002) *Blood*

99(12):4336-42; Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.*

20(15):3262-69). A pesar de que el ZEVALIN presenta actividad contra las células B del linfoma no Hodgkin

(NHL), su administración provoca citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™

(Gentuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo con un fármaco, compuesto de un
5 anticuerpo huCD33 enlazado a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda
por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; patentes de EE.UU. n.º 4970198; 5079233; 5585089;

5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de
anticuerpo con fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado al grupo de fármacos de los maitansinoides,
DM1, por medio de un enlazador de disulfuro SPP, está bien avanzado en ensayos clínicos de Fase II para el

10 tratamiento de cánceres que expresan CanAg, como los de colon, páncreas, gástricos y otros. MLN-2704

(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo con un fármaco, compuesto por
el anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana antiprostático (PSMA) enlazado al grupo de los maitansinoides,
DM1, está en fase de desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos auriestatinos,
la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a
15 anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para
CD30 en tumores hematológicos) (Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y se encuentran en
desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en la presente
memoria (por ejemplo, los descritos anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las

20 mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la
difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la
cadena de modecina A, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de

Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de la Momordica charantia, la curcina, la crotina, el
inhibidor de la Saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el

25 tricotecnos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232, publicado el 28 de octubre de 1993. Se dispone de
diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I,
¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de

agentes de unión a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP),
iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por
30 ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-
azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina),

diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-
2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta et
al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con

35 carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo.
Véase el documento WO94/11026.

También se contemplan en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como una calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y un CC1065, y los derivados de estas toxinas que tengan una actividad tóxica.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención (longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas de maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de Estados Unidos n.º 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

Las porciones de fármacos maitansinoides son porciones de fármacos que resultan atractivas para la elaboración de conjugados de anticuerpos con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación, con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estabilidad en plasma y (iv) resultan efectivos frente a distintas líneas celulares tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para elaborarlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.208.020 y 5.416.064, y en la Patente Europea 0 425 235 B1, y los descubrimientos de las mismas se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) describe los inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células del cáncer de colon en cultivo y demostró actividad antineoplásica en ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugaba por medio de un enlazado de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas celulares de cáncer de colon humanas, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un alto grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría ser mayor si se aumentase el número de moléculas maitansinoides por cada molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante enlace químico de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin hacer que disminuya significativamente la actividad biológica de ambos elementos del conjugado. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.208.020 (cuyos descubrimientos se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Una media de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por anticuerpo ha mostrado eficacia en la mejora de la citotoxicidad de las células diana sin afectar

negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, a pesar de que podría esperarse que incluso una molécula toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad en relación con el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la materia y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. En la patente de EE.UU. n.º 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no patentadas a las que anteriormente se ha
5 hecho referencia, por ejemplo, se describen maitansinoides adecuados. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y análogos modificados del maitansinol, en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como distintos ésteres del maitansinol.

Se conocen muchos grupos de enlace en la materia para producir conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluidos, por ejemplo, los revelados en la Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o en la Patente Europea 0 425
10 235 B1, and Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992), y la Solicitud de patente EE.UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de oct. 2004, (cuyos descubrimientos se incorporan expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que incluyen el componente enlazador SMCC
pueden prepararse de la manera que se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos enlazantes incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos
15 fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la estearasa, como se revela en las patentes anteriormente identificadas, y se prefieren grupos de disulfuro y tioéter. En la presente memoria descriptiva se dan ejemplos y se describen grupos enlazantes adicionales.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-
20 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de unión que se prefieren
25 sobre todo son N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de disulfuro.

El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace con éster se puede formar mediante reacción con un grupo hidroxilo que utilice técnicas de unión convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la
30 posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una forma de realización preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunas formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado
35 con dolastatinas o análogos peptídicos a la dolastatina y derivados, las auristatinas (patentes de EE.UU. n.º 5635483; 5780588). Se ha establecido que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP, y la división nuclear y celular (Woyke et al., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (U.S. 5663149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) *Antimicrob.*

Agents Chemother. 42:2961-2965). La porción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) ó C (carboxil) de la porción peptídica del fármaco (WO 02/088172).

Ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen las porciones DE y DF enlazadas a monometilauristatina por el extremo terminal N, como se revela en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Ser. EE.UU n.º 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, cuyo contenido se incorpora expresamente en su totalidad a modo de referencia.

Por lo general, las porciones de fármacos basadas en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre uno o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volume 1, págs 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las porciones de fármacos auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos siguientes: EE.UU. 5635483; EE.UU. 5780588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al., (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al., *Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit et al., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", U.S. Ser. n.º 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004, incorporados en la presente memoria descriptiva a modo de referencia en su totalidad (que revela, p.ej., enlazadores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como conjugados MMAE/MMAF a enlazadores).

iii. Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas para American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden utilizar están γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las Patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que es posible conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. n.º 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE.UU. n.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites*

258

fordii, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

Esta invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como por ejemplo la desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se dispone de una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluye At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para gammagrafía, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , un marcador giratorio para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como diagnóstico por imágenes obtenidas mediante resonancia magnética), como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, fluorina-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden incorporarse marcadores radiactivos o de otro tipo al conjugado utilizando las formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, fluorina-19 en vez de hidrógeno. Los marcadores como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} y In^{111} se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos detalladamente.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta et al., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo. Consultar el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de la droga citotóxica en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador acidolábil, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. n.º 5.208.020).

Los compuestos de la invención contemplan expresamente el ADC preparado con reactivos reticulares: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-4-

vinilsulfona)benzoato) que se comercializan (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de conjugados de anticuerpos con fármacos

En los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga a una o más porciones de un fármaco (D), por ejemplo, porciones de fármaco de 1 a 20 aproximadamente por anticuerpo, a través de un enlazador (L). Los ADC de la fórmula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un agente enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante una unión bivalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico del anticuerpo. En la presente memoria descriptiva, se describen los métodos adicionales para la preparación del ADC.



El enlazador puede estar formado por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobensiloxycarbonil ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato ("SIAB"). Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en la materia y algunos se describen en la presente memoria descriptiva. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", EE.UU. n.º de serie 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, cuyo contenido está incorporado íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

En ciertas formas de realización, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. Los componentes enlazadores ejemplares de aminoácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, tales como los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina. Los componentes enlazadores pueden designarse y optimizarse en su selectividad para la escisión mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, aunque sin limitarse a ellos: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en las porciones del enlazador y los reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros de intercadena

reducible, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos mediante conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitól). Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden ser introducidos en un anticuerpo (o un fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

Los conjugados de anticuerpos de la invención con fármacos también pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrofílicas, las cuales pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o el fármaco. Las azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de amina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos de carbonilo (aldehídos y cetonas) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (técnicas de bioconjugado de Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Puede hacerse que este aldehído reaccione con un fragmento de fármaco o un nucleófilo enlazador.

Del mismo modo, los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

Alternativamente, es posible realizar una fusión de proteínas que contengan el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separados por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado receptor del anticuerpo, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ej., la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ej. un radionucleótido).

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su conservación mediante la mezcla de anticuerpos con el grado deseado de pureza con moléculas vehículo, excipientes

o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tamponadas tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo, cloruro amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol bencilo, fenol o butilo benzil alcohol; alquil parabeno como el metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); bajo peso molecular (menos de 10 residuos) polipéptidos; proteínas, como cera albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidroílicos como la polivinilpirrolidone; aminoácidos como glicerina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacaridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como la EDTA; azúcares como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones de formación salina como el sodio; complejos metálicos (*por ej.* complejos Zn-proteína); y/o tensoactivos no surfactantes como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente memoria descriptiva también contiene más de un compuesto activo tal y como sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin que se pretende.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Estas técnicas se divulgan en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000).

Las formulaciones para administrar *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden elaborar preparaciones de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como por ejemplo LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de etilenvinilo y el ácido glicólico-ácido láctico permiten la liberación de moléculas por un período de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo menores. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo por un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, lo que ocasiona una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Es posible concebir estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo que intervenga. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es de formación de uniones

intermoleculares S-S mediante el intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización mediante la modificación de los residuos sulfhidrilos, liofilizando soluciones ácidas, controlando la humedad, utilizando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

Usos

5 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento o prevención de un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión y/o actividad de DLL4; los métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite dicho
10 tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear o prevenir el crecimiento de un tumor o la extensión de un cáncer; estos métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular y estos métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.
15

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un proceso patológico asociado a angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese
20 tratamiento. En algunas formas de realización, el proceso patológico asociado a angiogénesis es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización, el proceso patológico asociado a angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención se pueden unir al antígeno de otras especies. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para unirse a la actividad de un antígeno específico, por ejemplo, en un cultivo celular que contenga el antígeno, en humanos o en otros mamíferos que tengan el antígeno con el que un anticuerpo de la invención reaccione (por ejemplo chimpancé, babuino, tití, macaco de Java y macaco de la India, cerdo o ratón). En una forma de realización, el anticuerpo de la invención se puede usar para inhibir las actividades del antígeno mediante el contacto del anticuerpo con el antígeno de tal manera que la actividad del
30 antígeno quede inhibida. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteínica humana.

En una forma de realización, un anticuerpo de la invención se puede usar en un método para unir a un antígeno en un sujeto que sufre un trastorno asociado a un aumento de la expresión del antígeno y/o actividad, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de tal manera que se una el antígeno en el sujeto. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteínica humana. De manera alternativa, el sujeto puede ser un
35 mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo de la invención. Además, el sujeto puede ser un mamífero al que se le ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante la administración del antígeno o mediante la expresión de un trasgén del antígeno). Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención se puede administrar a mamíferos no humanos que

expresan un antígeno con el que la inmunoglobulina reaccione (por ejemplo, primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. Sobre esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, pruebas de dosis y periodos de administración).

5 Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, inhibir, retrasar la progresión, prevenir/retrasar la recidiva, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o procesos asociados a la expresión y/o actividad de una o más moléculas antigénicas.

Entre los trastornos están carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides.

10 Ejemplos más concretos de estas clases de cáncer serían el cáncer de células escamosas (por ejemplo, el cáncer de células escamosas epiteliales), el cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de células pulmonares pequeñas, el cáncer de células pulmonares no pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar y el carcinoma pulmonar escamoso), el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o estomacal (incluyendo el cáncer gastrointestinal), el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de riñón, el cáncer de vejiga, el cáncer de las vías urinarias, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer colorrectal, el 15 carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivares, el cáncer de hígado o renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el carcinoma anal, el carcinoma de pene, el melanoma, el mieloma múltiple y el linfoma de células B, el cáncer de cerebro, así como el de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona entre el grupo formado por cáncer de pulmón de células pequeñas, neuroblastomas, melanoma, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer colorrectal y 20 carcinoma hepatocelular. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona entre el grupo formado por cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y carcinoma de mama, incluidas las formas metastásicas de estos tipos de cáncer.

En algunas formas de realización, se administra al paciente el inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos. En algunas formas de realización, el inmunoconjugado y/o 25 el antígeno al que va unido es internalizado por la célula, lo que ocasiona una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado para inactivar la célula diana a la que se une. En una forma de realización, el agente citotóxico actúa o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. En una forma de realización, el agente citotóxico actúa o interfiere con la polimerización de microtúbulos. Como ejemplos de los citados agentes citotóxicos se incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos citados en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, un 30 maitansinoide, una auristatina, una dolastatina o una caliqueamicina), un isótopo radioactivo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o junto con otras composiciones en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede administrar conjuntamente con otro anticuerpo, agente o agentes quimioterapéuticos (incluidos cócteles de agentes quimioterapéuticos), otro agente o agentes citotóxicos, agente o 35 agentes angiogénicos, citocinas y/o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, puede ser especialmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos que también inhiban el crecimiento tumoral, por ejemplo, agentes anti-VEGF, incluidos anticuerpos anti-VEGF. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo, irradiación con

haces externos o tratamiento con un agente marcado radioactivo, como un anticuerpo). Las terapias combinadas descritas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes, y/o después, de la administración de la terapia o terapias asociadas.

5 *Terapias combinada*

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona tratamientos combinados en los que un anticuerpo anti-DLL4 se administra con otro tratamiento. Por ejemplo, anticuerpos anti-DLL4 se usan en combinación con antineoplásicos o tratamientos antineovascularizantes para tratar diversos procesos neoplásicos o no. En una forma de realización, el proceso neoplásico o no neoplásico se caracteriza por un proceso patológico asociado a angiogénesis anómala o no deseada. El anticuerpo anti-DLL4 se puede administrar en serie o en combinación con el otro agente terapéutico que es eficaz para estos fines, bien en la misma composición o en otra. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar diversos inhibidores de la DLL4.

La administración del anticuerpo anti-DLL4 se puede efectuar simultáneamente, por ejemplo, en composición única o como dos o más composiciones distintas, utilizando la misma vía de administración o vías de administración diferentes. Otra posibilidad, que se puede combinar con lo anterior, es la administración secuencial, en cualquier orden. En determinadas formas de realización, pueden transcurrir intervalos de tiempo que oscilen de minutos a días, semanas o meses entre la administración de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente antineoplásico se puede administrar primero, seguido por el inhibidor de la DLL4. Sin embargo, la administración simultánea o la administración en primer lugar del anticuerpo anti-DLL4 también está prevista.

Las cantidades eficaces de agentes terapéuticos administrados en combinación con un anticuerpo anti-DLL4 serán fijadas por el médico o veterinario, según su criterio. La administración y el ajuste de la dosis se realiza para lograr el máximo control de los procesos que se van a tratar. La dosis dependerá, además, de factores como el tipo de agente terapéutico que se vaya a utilizar y el paciente específico que vaya a tratarse. Las dosis adecuadas para cualquiera de los antineoplásicos son aquellas que se utilizan actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del antineoplásico y el anticuerpo anti-DLL4. En determinadas formas de realización, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un único inhibidor. El término "potenciar" se refiere a una mejora de la eficacia de un agente terapéutico en su dosis habitual o aprobada. Véase también el apartado Composiciones farmacéuticas de la presente memoria descriptiva.

Típicamente, los anticuerpos anti-DLL4 y antineoplásicos son aptos para las mismas enfermedades o enfermedades similares para bloquear o reducir un trastorno patológico como crecimiento tumoral o crecimiento de una célula cancerosa. En una forma de realización, el antineoplásico es un antiangiogénico.

El tratamiento antiangiogénico en relación con el cáncer es una estrategia de tratamiento para el cáncer destinada a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales necesario para proporcionar nutrientes que promuevan el crecimiento tumoral. Debido a que la angiogénesis interviene tanto en el crecimiento del tumor primario como en la metástasis, el tratamiento angiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en el sitio primario, así como prevenir la metástasis de tumores en sitios secundarios, lo que permite atacar a los tumores con otros agentes terapéuticos.

Se han identificado muchos otros agentes antiangiogénicos y son bien conocidos en el sector, incluidos los enumerados en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, enumerados en Definiciones y, por ejemplo, por Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Véase también la solicitud de patente de Estados Unidos

- 5 US20030055006. En una forma de realización, un anticuerpo anti-DLL4 se utiliza en combinación con un anticuerpo neutralizador del anti-VEGF (o de un fragmento del mismo) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF, incluidos, por ejemplo, fragmentos del receptor soluble de VEGF (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptameros capaces de bloquear el VEGF o el VEGFR, neutralizar anticuerpos anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosincinasas (RTK) del
- 10 VEGFR, estrategias antisentido para el VEGF, ribozimas frente al VEGF o receptores del VEGF, variantes antagonistas del VEGF y cualquier combinación de todos ellos. Alternativamente, o adicionalmente, dos o más inhibidores de la angiogénesis pueden ser opcionalmente administrados conjuntamente al paciente, además del antagonista del VEGF u otro agente. En alguna forma de realización, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, antineoplásicos, se pueden administrar en combinación con anticuerpo anti-DLL4, el antagonista del
- 15 VEGF y un agente antiangiogénico.

- En determinados aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para tratamiento neoplásico combinado con un anticuerpo anti-DLL4 incluyen otros tratamientos contra el cáncer (por ejemplo, tratamiento quirúrgico, radioterapia (por ejemplo, con irradiación o administración de sustancias radiactivas), quimioterapia, tratamiento con antineoplásicos enumerados en la presente memoria descriptiva y conocidos en el sector, o
- 20 combinaciones de ellos). De manera alternativa o adicional, dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno o a dos o más antígenos distintos divulgados en la presente memoria descriptiva se pueden administrar conjuntamente al paciente. En ocasiones, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente.

Agentes quimioterapéuticos

- En determinados aspectos, la invención proporciona un método de bloquear o reducir el tratamiento tumoral o el crecimiento de una célula cancerosa, mediante la administración de cantidades eficaces de un antagonista de la
- 25 DLL4 y/o uno o más inhibidores de la angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos a un paciente propenso al cáncer o al que se le ha diagnosticado cáncer. Se pueden usar diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista no exhaustiva y que puede servir como ejemplo de antineoplásicos se incluye en la presente memoria descriptiva en "Definiciones".

- 30 Como comprenderán los expertos en la materia, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos estarán en torno a las aquellas ya empleadas en tratamientos clínicos en los que los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros quimioterapéuticos. Es probable que la dosis varíe en función del proceso que se esté tratando. El médico que administre el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto.

- 35 La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células cancerígenas. El término "crecimiento tumoral recidivante" o "proliferación recidivante de células tumorales" se utiliza para describir un proceso en el que los pacientes sometidos o tratados con un o más de los tratamientos actualmente disponibles (por ejemplo, tratamientos para el cáncer, como

quimioterapia, radioterapia, tratamiento quirúrgico, tratamiento hormonal y/o tratamiento biológico/inmunoterapia, tratamientos con anticuerpos anti-VEGF, especialmente un tratamiento estándar para el cáncer de que se trate) no es clínicamente adecuado para tratar a los pacientes o los pacientes ya no están experimentando efecto beneficioso alguno con el tratamiento y necesitan otro tratamiento adicional eficaz. Como se usa en la presente memoria

descriptiva, la frase también se puede referir a un proceso de un paciente "refractario/que no responde al tratamiento", por ejemplo, que describa pacientes que responden a tratamiento pero sufran efectos secundarios, desarrollen resistencia, no respondan al tratamiento, no respondan satisfactoriamente al tratamiento, etc. En diversas formas de realización, un cáncer es un crecimiento tumoral recidivante o una proliferación recidivante de células cancerosas en los que el número de células cancerosas no se ha reducido aún significativamente, o ha aumentado, o el tamaño del tumor no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o no sigue reduciéndose su tamaño o el número de células cancerosas. Se puede determinar si las células cancerosas constituyen un crecimiento tumoral recidivante o una proliferación recidivante de células tumorales bien *in vivo* bien *in vitro* mediante cualquier método conocido en el sector para analizar la eficacia del tratamiento en células cancerosas, utilizando los sentidos aceptados en el sector de "recidivante" o "refractario" o "que no responde al tratamiento" en este contexto. Un tumor resistente a un tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de un crecimiento tumoral recidivante.

La presente invención proporciona métodos de bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células cancerosas en un sujeto, mediante la administración de uno o más anticuerpos anti-DLL4 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células cancerosas en el sujeto. En determinadas formas de realización, el antagonista se puede administrar después del tratamiento para el cáncer. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-DLL4 se administran simultáneamente con tratamiento para el cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 alterna con otro tratamiento para el cáncer, en cualquier orden. La invención también engloba métodos de administración de uno o más anticuerpos inhibidores para prevenir el inicio o la recurrencia del cáncer en pacientes predispuestos a sufrir cáncer. Por lo general, el sujeto estaba o está recibiendo simultáneamente tratamiento para el cáncer. En una forma de realización, el tratamiento para el cáncer es un tratamiento con un antiangiogénico, por ejemplo, un antagonista del VEGF. El agente antiangiogénico incluye aquellos conocidos en la materia y aquellos encontrados en Definiciones en la presente memoria descriptiva. En una forma de realización, el antiangiogénico es un anticuerpo neutralizador anti-VEGF o fragmento del mismo (por ejemplo A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA) o LUCENTIS® (Genentech, South San Francisco, CA)), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n.º 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202; EP 0666868B1; las Solicitudes de Patentes de EE.UU. 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004); y, el documento WO2005012359. Otros agentes se pueden administrar en combinación con antagonistas del VEGF y un anticuerpo anti-DLL4 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células tumorales, por ejemplo, véase la sección Terapia de combinación en la presente memoria descriptiva.

El anticuerpo de la invención (y el agente terapéutico asociado) se administra(n) por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento

local, la vía intralesional o intravítrea. Las infusiones parentales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea. Además, el anticuerpo se administra correctamente mediante infusión de efecto rápido con dosis del anticuerpo cada vez menores. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones vía intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición del anticuerpo de la invención debe formularse, dosificarse y administrarse de una manera consistente empleando una práctica médica adecuada. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno específico sometido a tratamiento, el mamífero específico sometido a tratamiento, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, la localización de la administración del agente, el método de administración, la regulación de la administración y otros factores conocidos por los facultativos. El anticuerpo puede formularse opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores ya abordados con anterioridad. Estos son generalmente usados en las mismas dosis y con las mismas vías de administración descritas en la presente memoria descriptiva o aproximadamente entre 1% y 99% de las dosis empleadas hasta este momento.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza aislado o en combinación con otros agentes como los quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración a un paciente es de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ej., 0,1 mg/kg -10 mg/kg) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria normal puede oscilar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la misma. Un ejemplo de dosis del anticuerpo se situaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg . Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de manera intermitente, por ejemplo, una vez por semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una mayor carga de dosis inicial seguida de una o más dosis menores. Un ejemplo de pauta posológica comprende la administración de una dosis inicial aproximada de 4 mg/kg , seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. No obstante, también pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Los anticuerpos anti-DLL4 de la invención son útiles en ensayos que detectan la expresión de DLL4 (como ensayos diagnósticos o pronósticos) en células o tejidos específicos en los que los anticuerpos están marcados como se describe más adelante y/o están inmovilizados en una matriz insoluble.

5 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para la detección de DLL4, los cuales comprenden la detección del complejo formado por DLL4 y anticuerpo anti-DLL4 en la muestra. Por "detección" se entiende en la presente memoria descriptiva la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

10 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de DLL4, los cuales incluyen la detección del complejo formado por DLL4 y anticuerpos anti-DLL4 en una muestra biológica procedente de un paciente que tenga o posiblemente tenga el trastorno. En algunas formas de realización, la expresión de DLL4 es una expresión aumentada o anómala (no deseada). En algunas formas de realización, el trastorno es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-DLL4 descritos en la presente memoria descriptiva, donde el anticuerpo anti-DLL4 comprende un marcador detectable.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-DLL4 descritos en la presente memoria descriptiva y DLL4. En algunas formas de realización, el complejo está *in vivo* o *in vitro*. En algunas formas de realización, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-DLL4 está marcado de forma detectable.

20 Los anticuerpos anti-DLL4 se pueden usar para la detección de DLL4 en cualquiera de diversos métodos de detección bien conocidos. Por ejemplo, se puede realizar un análisis de una muestra biológica para DLL4 mediante la obtención de la muestra de una fuente deseada, añadiendo y mezclando la muestra con anticuerpo anti-DLL4 para permitir al anticuerpo formar el complejo anticuerpo/DLL4 con cualquier DLL4 presente en la mezcla, y la detección de cualquier complejo anticuerpo/DLL4 presente en la mezcla. La muestra biológica puede ser preparada para su análisis mediante métodos conocidos en el sector que son aptos para la muestra concreta. Los métodos de añadir y
25 mezclar la muestra con anticuerpos y los métodos de detección del complejo anticuerpo/DLL4 se eligen según el tipo de ensayo utilizado. Estos ensayos incluyen ensayos inmunoquímicos, ensayos competitivos, inmunoanálisis de doble anticuerpo (tipo *sándwich*) y ensayos de inhibición de ésteres.

30 Todos los métodos analíticos para detección de DLL4 usan uno o más de los reactivos siguientes: análogo DLL4 marcado, análogo DLL4 inmovilizado, anticuerpo anti-DLL4 marcado, anticuerpo anti-DLL4 inmovilizado y conjugados de ésteres. Los reactivos marcados también se conocen como "trazadores".

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de DLL4 y anticuerpo anti-DLL4. Se conocen numerosos marcadores para uso en inmunoensayos y entre los ejemplos figuran las porciones que se pueden detectar directamente, como marcadores radioactivos, quimioluminescentes o fluorocromo, así como porciones, como enzimas, que se deben hacer reaccionar o derivar para que sea posible
35 detectarlas. Ejemplos de estos marcadores son:

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de DLL4 y anticuerpo anti-DLL4. Se conocen numerosos marcadores para uso en inmunoensayos y entre los ejemplos figuran las porciones que se pueden detectar directamente, como marcadores radioactivos, quimioluminescentes o fluorocromo, así como

porciones, como enzimas, que se deben hacer reaccionar o derivar para que sea posible detectarlas. Ejemplos de estos marcadores son los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos como algunos quelantes téreos raros o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferon, luciferinas (por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de EE.UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores rotatorios, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Se dispone de métodos convencionales para unir estos marcadores covalentemente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, se pueden usar agentes de unión como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, benzidina bis-diazotidazada y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores enzimáticos, fluorescentes y quimioluminiscentes antes descritos. Véanse, por ejemplo, Patentes de EE.UU. n.º 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferentes en la presente memoria descriptiva son enzimas como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de este marcador, incluidas las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento de manipulación estándar para cualquier experto en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), págs. 147-166.

Para ciertos métodos de ensayo es necesaria la inmovilización de reactivos. La inmovilización supone separar el anticuerpo anti-DLL4 de cualquier DLL4 que permanezca libre en solución. Tradicionalmente, esto se consigue bien insolubilizando el anticuerpo anti-DLL4 o el análogo de DLL4 antes del procedimiento de ensayo, como mediante adsorción en una superficie o matriz insoluble a agua (Bennich et al., EE.UU. 3.720.760), mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o mediante insolubilización del anticuerpo anti-DLL4 o del análogo de DLL4 después, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

La expresión de proteínas en una muestra se puede examinar usando protocolos de tinción e inmunohistoquímica. La tinción inmunohistoquímica de cortes tisulares ha demostrado ser un método fiable de evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para detectar y visualizar antígenos celulares *in situ*, por lo general mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de la muestra, se puede utilizar una muestra celular o de tejido procedente de un mamífero (normalmente, un paciente humano). Entre los ejemplos de muestras están células cancerosas como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. Las muestras se pueden obtener mediante diversos procedimientos conocidos en el sector, incluidas, aunque sin limitarse a ellas, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una forma de realización, la muestra se fija y embebe en parafina o similares. La muestra de tejido se puede fijar (es decir, preservar) mediante métodos convencionales. Cualquier experto en la materia sabrá que la elección de un fijador depende del fin para el

cual se procederá a marcar histológicamente a la muestra o del método de análisis que se utilice. Cualquier experto en la materia también sabrá que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijador utilizado.

La IHC se puede realizar en combinación con otras técnicas, como tinción morfológica y/o hibridización *in situ* fluorescente. Se dispone de dos métodos generales de IHC: ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, DLL4) está determinada directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, como un marcador fluorescente o un anticuerpo primario marcado con una enzima, el cual se puede visualizar sin mayor interacción con el anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y, luego, un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Si el anticuerpo secundario se conjuga a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para permitir la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con distintos epítomos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario utilizado para inmunohistoquímica estará marcado habitualmente con una porción detectable. Se dispone de numerosas marcas que pueden agruparse, por lo general, en las siguientes categorías:

Aparte de los procedimientos de preparación de la muestra tratados anteriormente, tal vez se requiera un nuevo tratamiento del corte histológico antes o después de aplicar la IHC, o durante su aplicación. Por ejemplo, se pueden realizar métodos de recuperación de epítomos, como calentamiento de la muestra tisular en solución tamponada con citrato (véase, por ejemplo, Leong et al., *Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Después de un paso opcional de bloqueo, el corte histológico queda expuesto al anticuerpo primario durante un tiempo suficiente y en condiciones idóneas para que el anticuerpo primario se una al antígeno de la proteína diana en la muestra de tejido. Las condiciones idóneas para lograr esto se pueden determinar mediante experimentos habituales. El alcance de la unión del anticuerpo a la muestra se determina mediante el uso de uno de los marcadores detectables mencionados anteriormente. Preferiblemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico como cromogén de 3,3'-diaminobenzidina. Preferiblemente, el marcador enzimático se conjuga al anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de ratón y el anticuerpo secundario es anticuerpo anticonejo de cabra).

Las muestras así preparadas se pueden montar y cubrir en la placa. A continuación, se determina la evaluación de la muestra, por ejemplo, usando un microscopio, y se pueden emplear criterios de intensidad de la tinción usados habitualmente en el sector. Los criterios de intensidad de la muestra se pueden evaluar del siguiente modo:

TABLA 2

Modelo de tinción	Puntuación
No se observa tinción en las células.	0
Se detecta tinción leve/apenas perceptible en más del 10% de las células.	1+
Se detecta tinción débil a moderada en más del 10% de las células.	2+
Se detecta tinción moderada a intensa en más del 10% de las células.	3+

Por lo general, una puntuación en el modelo de tinción de 2+ o superior en un ensayo IHC tiene valor pronóstico y/o diagnóstico. En algunas formas de realización, una puntuación en el modelo de tinción de 1+ o superior tiene valor diagnóstico y/o pronóstico. En otras formas de realización, una puntuación en el modelo de tinción de 3+ o superior tiene valor diagnóstico y/o pronóstico. Se entiende que, cuando las células y/o tejidos de un tumor o adenoma de colon se examinan mediante IHC, la tinción se suele determinar o evaluar en la célula y/o tejido tumoral (frente al tejido circundante o estroma que puede estar presente en la muestra).

Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o de inmunoanálisis de doble anticuerpo (tipo "sándwich"), son bien conocidos y ampliamente usados en el sector diagnóstico comercial.

Los ensayos competitivos dependen de la capacidad de un análogo de DLL4 del trazador para competir con la muestra de prueba de DLL4 en un número limitado de sitios de unión a antígeno del anticuerpo anti-DLL4. Por lo general, el anticuerpo anti-DLL4 se insolubiliza antes o después de la competición y, luego, el trazador y DLL4 unidos al anticuerpo anti-DLL4 se separan del trazador y de DLL4 no unidos. Esta separación se logra decantando (donde la molécula de enlace estaba preinsolubilizada) o centrifugando (donde la molécula de enlace se había precipitado tras la reacción competitiva). La cantidad de DLL4 de la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unida según medición de la cantidad de sustancia marcadora. Las curvas dosis-respuesta con cantidades conocidas de DLL4 se preparan y comparan con el resultado de la prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de DLL4 presente en la muestra de prueba. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando las enzimas se usan como marcadores detectables.

Otra especie de ensayo competitivo, denominado un ensayo "homogéneo", no exige fase de separación. En este caso, se prepara y utiliza un conjugado de una enzima con DLL4, de forma que, cuando el anticuerpo anti-DLL4 se une a DLL4, la presencia del anticuerpo anti-DLL4 modifica la actividad enzimática. En este caso, el DLL4 o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para uso con anticuerpos anti-DLL4, de forma que la unión al anticuerpo anti-DLL4 inhibe o potencia la actividad enzimática del marcador. Este método se aplica ampliamente con el nombre de EMIT.

Se usan conjugados de ésteres en métodos de obstaculización de ésteres para ensayos homogéneos. Estos conjugados se sintetizan mediante enlace covalente de un hapteno de bajo peso molecular a un fragmento de DLL4 pequeño, de forma que el anticuerpo anti-hapteno no pueda unirse al conjugado al mismo tiempo que el anticuerpo anti-DLL4. Con este procedimiento, el DLL4 presente en la muestra de prueba se unirá al anticuerpo anti-DLL4, lo

que permitirá al antihapteno unirse al conjugado y esto, a su vez, ocasiona un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en fluorescencia cuando el hapteno es un fluoroforo.

Los ensayos tipo "sandwich" son especialmente útiles para la determinación del DLL4 y los anticuerpos anti-DLL4. En ensayos secuenciales tipo "sandwich", se usa un anticuerpo anti-DLL4 inmovilizado para adsorber el DLL4 de la muestra de prueba, se retira la muestra de prueba mediante lavado, el DLL4 unido se utiliza para adsorber un segundo anticuerpo anti-DLL4 marcado y el material unido se separa luego del trazador residual. La cantidad de trazador unido es directamente proporcional a la DLL4 de la muestra de prueba. En ensayos "sandwich simultáneos" la muestra de prueba no se separa antes de añadir el anticuerpo anti-DLL4 marcado. Un ensayo secuencial tipo "sandwich" que utilice un anticuerpo monoclonal anti-DLL4 como un anticuerpo y un anticuerpo policlonal anti-DLL4 como otro de los anticuerpos es útil en muestras de prueba para detección de DLL4.

Lo anterior no son más que ejemplos de ensayos de detección de DLL4. Otros métodos desarrollados ahora o en el futuro que utilicen anticuerpo anti-DLL4 para la determinación de DLL4 están incluidos en el ámbito de la presente memoria descriptiva, incluidos los bioensayos descritos en la misma.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se propone un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los desórdenes descritos anteriormente. El elemento de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a él. Entre los envases adecuados se encuentran, por ejemplo, botes, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar hechos de diversos materiales, como vidrio o plástico. El envase tiene una composición que, por sí sola o combinada con otra u otras composiciones, es eficaz en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se ha utilizado para el tratamiento de la afección concreta, como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en él, donde la composición comprenda un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en él, donde la composición comprenda otro agente terapéutico, incluyendo, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o un agente antiangiogénico, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab). El artículo de fabricación de esta forma de realización de la invención puede comprender también un prospecto que indique que la composición del primer y del segundo anticuerpos se puede usar para tratar un proceso concreto, por ejemplo, cáncer. De modo alternativo, o adicional, el elemento de fabricación puede comprender un segundo (o tercer) envase que contiene una solución farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWI), una solución salina fosfatada, una solución de Ringer y una solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidas otras soluciones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

A continuación se incluyen ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. A partir de la descripción general proporcionada anteriormente, se entiende que se pueden dar varias formas de realización.

EJEMPLOS

Los reactivos disponibles comercialmente mencionados en los Ejemplos se utilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de estas células identificadas en los Ejemplos siguientes y en toda la especificación, mediante los números de entrada ATCC® es American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108. Las referencias citadas en los Ejemplos se enumeran tras los ejemplos. Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la misma a modo de referencia.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

En los Ejemplos se utilizaron los materiales y métodos que se indican a continuación.

Ensayos de partículas en gel de fibrina con HUVEC. Se ha proporcionado información exhaustiva del ensayo de partículas en gel de fibrina con HUVEC (Nakatsu, M. N. et al., *Microvasc Res* 66, 102-12 (2003)). Tres partículas Cytodex™ (Amersham Pharmacia Biotech) fueron recubiertas con 350 a 400 HUVEC por partícula. Unas 200 partículas recubiertas con HUVEC se introdujeron en coágulo de fibrina en un pocillo de una placa para cultivo tisular de 12 pocillos. Encima del coágulo se colocaron 8×10^4 células SF. Los análisis concluyeron entre el día 7 y el día 9 para procesarlos para inmunotinción y resonancia magnética nuclear. En algunos experimentos, se visualizaron brotes de HUVEC mediante tinción con anti-CD31 biotinilado (clon WM59, eBioscience) y estreptavidina-Cy3. Para la tinción de los núcleos de las HUVEC, los geles de fibrina permanecieron fijados durante toda una noche en paraformaldehído (PFA) al 2% y se procedió a su tinción con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma). Para la tinción de Ki67, los geles de fibrina fueron tratados con 10X tripsina-EDTA durante 5 minutos para eliminar las SF de la capa superior; luego, se procedió a neutralizarlos con FBS al 10% en PBS y a fijarlos y mantenerlos así durante toda una noche en PFA al 4%. Luego, se bloquearon los geles de fibrina con 10% de suero de cabra en PBSET durante 4 horas; se incubaron durante toda la noche con Ki67 anti-ratón de conejo (formulación lista para su uso, clon Sp6, Lab Vision), tras lo cual se procedió a detección secundaria con IgG-Cy3 anti-conejo (Jackson ImmunoResearch). Las incubaciones que se mantuvieron durante toda una noche se realizaron a 4 °C.

Estudio de la retina neonatal de ratón. A ratones CD1 neonatos procedentes de la misma camada se les inyectó por vía i.p. PBS o YW26.82 (10 mg/kg) en P1 y P3. Se extrajeron los ojos en P5 y se fijaron con PFA al 4% en PBS durante una noche. Las retinas diseccionados se bloquearon con 10% de suero de cabra en PBST durante 3 horas; luego, se incubaron toda una noche con anticuerpos primarios. El cóctel primario incluía isolectina B4 biotinilada (25 µg/ml, *Bandeiraea simplicifolia*; Sigma) y uno de los compuestos siguientes: Ki67 anti-ratón de conejo (1:1, lista para su uso, clon Sp6, Lab Vision) o SMA antialfa conjugada con Cy3 de ratón (1:2000, Sigma-Aldrich), con 10% de suero en PBLEC (1% Triton X-100, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂, 0,1 mM MnCl₂, en PBS pH 6,8). Luego, se lavaron las retinas en PBST y se incubaron toda la noche con una combinación con anticuerpos secundarios de estreptavidina Alexa Fluor® 488 (1:200; Molecular Probes) e IgG anti-ratón conjugada con Cy3 (1:200; Jackson ImmunoResearch). Una vez finalizada la tinción, se procedió a una nueva fijación con PFA al 4% en PBS. Todas las incubaciones de una noche de duración se efectuaron a 4 °C. Se obtuvieron imágenes de las retinas montadas de plano mediante microscopio fluorescente confocal.

Modelos de tumor. Se utilizaron ratones hembra atípicos de color beis de 8 a 10 semanas de vida. Para obtener tumores subcutáneos, se inyectó a los ratones una suspensión de 0,1 ml de células que contenía un 50% de

matrigel(BD Bioscience) en el flanco posterior derecho. En cada ratón se inyectaron 5×10^6 células HM7 de cáncer de colon humanas, 10×10^6 células Colo205 humanas de carcinoma de colon, 10×10^6 células Calu6 humanas de carcinoma de pulmón, 10×10^6 células MV-522 humanas de carcinoma de pulmón, 10×10^6 células WEHI-3 murinas de leucemia, 10×10^6 células EL4 murinas de linfoma, 10×10^6 células SK-OV-3 X1 humanas de cáncer de ovario, 10×10^6 de células LL2 murinas de cáncer de pulmón, 10×10^6 células EL4 de linfoma/leucemia o 10×10^6 células H1299 de cáncer de pulmón de células pequeñas. Para el modelo MDA-MB-435 de melanoma humano, se inyectó a los ratones en los panículos adiposos mamarios una suspensión de 0,1 ml de células (5×10^6) que contenía 50% de matrigel. El anticuerpo anti-DLL4 YW26.82 se administró por vía i.p. (10 mg/kg de peso corporal, dos veces por semana). Para los modelos tumorales siguientes, a cada ratón del ensayo se le implantó subcutáneamente, en el flanco derecho, un fragmento tumoral (1 mm³): SKMES-1 de cáncer de pulmón de células no pequeñas, MX-1 de cáncer de mama humano, SW620 de cáncer colorrectal humano y LS174T de adenocarcinoma humano. El crecimiento tumoral se cuantificó mediante mediciones con un calibrador. El volumen del tumor (mm³) se determinó midiendo su longitud (l) y anchura (a) y calculando el volumen ($V = la^2/2$). En cada grupo se incluyó de 10 a 15 animales. La comparación estadística de los grupos de tratamiento se realizó utilizando la prueba de la t de Student de dos colas.

Ensayo inmunohistoquímico y marcación vascular de tumores. Se anestesió a los ratones con isoflurano. Se inyectó por vía intravenosa Lectina *Lycopersicon esculentum* marcada con FITC (150 µg en 150 µl de NaCl al 0,9%; Vector Laboratories) y se dejó que circulara por el torrente sanguíneo 5 minutos antes de proceder a la perfusión sistémica. La vasculatura fue perfundida de forma transcardiaca con PFA al 1% en PBS durante 3 minutos. Se extrajeron los tumores y se fijaron por inmersión en el mismo fijador durante 2 horas y, después, se procedió a su incubación durante toda la noche en sacarosa al 30% para crioprotección y, luego, se embebieron en OCT. Se procedió a la tinción de los cortes (de 4 µm de grosor) con CD31 anti-ratón (1:50, BD Pharmingen) y, después, por IgG anti-ratón de cabra Alexa 594 (1:800, Molecular Probes).

Estudio histológico e inmunohistoquímico de intestinos de ratón. Se obtuvieron cortes de 3 µm de grosor de tejidos del intestino delgado de ratón fijados en formol y embebidos en parafina. La identificación histoquímica de los tipos celulares del intestino se realizó mediante tinción con azul alciano, siguiendo las instrucciones del fabricante (PolyScientific). Para la tinción con anti-Ki67, se pretrataron los cortes con la solución Target Retrieval Solution (S1700, DAKO) y se incubaron con anti-Ki67 de ratón (1:200, clon SP6, Neomarkers). Se detectaron anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra a 7,5 g/ml con el kit Vectastain ABC Elite Kit (Vector labs). Se procedió a tinción de contraste con hematoxilina de Mayer de todos los cortes sometidos previamente a tinción con Ki67. Para tinción con HES-1, se utilizó HES-1 anti-ratón (clon NM1, MBL, International), seguida por TSA-HRP.

Interferencia del ARN. Se adquirieron a Dharmacon dúplex de ARN de escasa interferencia SMARTpool (ARNsi) que actuaban sobre DLL4 humana y Si Control Non-Target siRNA n.º 2. Se realizó la transfección de los dúplex de ARNsi (50 nM) con células HUVEC a una confluencia del 40% utilizando OptiMEM-1® y Lipfectamine™ 2000 (Invitrogen). El análisis FACS se llevó a cabo 48 horas después de la transfección del ARNsi.

Las secuencias de los 4 ARNsi anti-DLL4 de SMART Pool eran las siguientes:

CAACTGCCCTTATGGCTTTT (identificador de secuencia n.º: 62) (Oligo 1, sentido),

AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT (identificador de secuencia n.º: 63) (Oligo 1, antisentido),

CAACTGCCCTTCAATTTCATT (identificador de secuencia: 64) (Oligo 2, sentido),

TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT (identificador de secuencia n.º: 65) (Oligo 2, antisentido),
TGACCAAGATCTCAACTACTT (identificador de secuencia n.º: 66) (Oligo 3, sentido),
GTAGTTGAGATCTTGGTCATT (identificador de secuencia n.º: 67) (Oligo 3, antisentido),
GGCCAACATATGCTTGTGAATT (identificador de secuencia n.º: 68) (Oligo 4, sentido),
TTCACAAGCATAGTTGGCCTT (identificador de secuencia n.º: 69) (Oligo 4, antisentido).

Ligando Notch: ELISA con bloqueo de Notch. Se revistieron placas de microtitulación de 96 pocillos con

Notch1-Fc recombinante de rata (rrNotch1-Fc, R&D Systems) a 0,5 µg/ml. En el ensayo se utilizó medio de cultivo
condicionado que contenía DLL4-AP (aminoácidos 1-404 de DLL4 fusionado a fosfatasa alcalina de placenta
humana). Para preparar el medio de cultivo condicionado, se transfectaron provisionalmente 293 células con

plásmido que expresaba DLL4-AP con el reactivo Fugen6 (Roche Molecular Biochemicals). Cinco días después de
la transfección, el medio condicionado se recolectó, filtró y almacenó a 4 °C. Los anticuerpos purificados titulados de
0,15 a 25 µg/ml se preincubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con medio condicionado con DLL4-AP a una
dilución que permitía una unión máxima posible del 50% al rrNotch1-Fc recubierto. Luego, se añadió la mezcla
anticuerpo/DLL4-AP a la placa recubierta con rrNotch1-Fc durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se

lavarón las placas varias veces en PBS. La DLL4-AP unida se detectó utilizando PNPP en una sola fase (Pierce)
como sustrato y una medición de la absorbancia (OD) a 405 nm. Se realizó un ensayo idéntico con DLL1-AP (DLL1
humana, aminoácido 1-445). Se llevaron a cabo ensayos similares con DLL4-His purificada (DLL4 humana marcada
con His en el extremo C terminal, aminoácido 1-404) y Jag1-His (R&D system). Los ligandos unidos marcados con
His se detectaron con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-His de ratón (1 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals),
anti-ratón de cabra biotinilado (Jackson ImmunoResearch) y estreptavidina-AP (Jackson ImmunoResearch).

Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa en tiempo real. La extracción del ARN total de las células
HUVEC en cultivo bidimensional se llevó a cabo utilizando el Mini Kit RNeasy® (Qiagen) siguiendo las
instrucciones del fabricante. Para extraer el ARN total de las células HUVEC cultivadas en geles de fibrina, se trataron
los geles de fibrina con 0X tripsina-EDTA (Gibco) durante 5 minutos para extraer los fibroblastos de la capa superior
y, después, se procedió a neutralización con FBS al 10% en PBS. Los coágulos de gel se extrajeron, seguidamente, de
los pocillos con cultivo tisular y se sometieron a centrifugación (10K durante 5 minutos) en microtubos para eliminar
el exceso de fluido. Los "pelletes" de gel resultantes fueron sometidos a lisis con solución tamponada de lisis (Mini
Kit RNeasy®) y, luego, fueron procesados con las células HUVEC en cultivo bidimensional. La calidad del ARN se
evaluó utilizando RNA 6000 Nano Chips y el bionanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Las reacciones de
RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron por triplicado utilizando 7500 Real Time PCR System (Applied
Biosystems). Se utilizó GAPDH humano como gen de referencia para normalización. Los niveles de expresión se
expresan como la media (±SEM) del número de cambios en el ARNm con respecto al control a partir de 3
valoraciones distintas. Las secuencias de las sondas y cebadores anversos y reversos para VEGFR2, TGFβ2 y
GAPDH fueron las siguientes:

TGFβ2

Anverso: GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (identificador de secuencia n.º: 70)

Reverso: CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (identificador de secuencia n.º: 71)

Sonda: AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (identificador de secuencia: 72)

VEGFR2

Anverso: CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (identificador de secuencia n.º: 73)

Reverso: TGC AGT CCG AGG TCC TTT (identificador de secuencia n.º: 74)

Sonda: CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (identificador de secuencia n.º: 75)

GAPDH

Anverso: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (identificador de secuencia n.º: 76)

Reverso: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (identificador de secuencia n.º: 77)

Sonda: CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (identificador de secuencia n.º: 78)

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos anti-DLL4 en fagos

Las librerías de representación en imágenes de anticuerpos de fagos sintéticos se construyeron en una estructura única (anticuerpo anti-ErbB2 humanizado) mediante introducción de diversidad dentro de regiones de determinación de complementariedad (CDR) de las cadenas ligera y pesada (Lee, C. V. et al., *J Mol Biol* 340, 1073-93 (2004); Liang, W. C. et al., *J Biol Chem* 281, 951-61 (2006)). Se realizó detección de placas con librerías nativas contrastándolas con DLL4 humana marcada con His (aminoácido 1-404) inmovilizada en inmunoplasacas Maxisorp™. Tras cuatro series de enriquecimiento, se eligieron clones de forma aleatoria y se identificaron agentes de unión específicos mediante ELISA en fagos. Los clones resultantes de unión a hDLL4 se sometieron a un nuevo proceso de detección con proteína DLL4 murina marcada con His para identificar clones de distintas especies. Para cada clon de fago positivo, se subclonaron regiones variables de las cadenas ligera y pesada en vectores de expresión pRK que fueron diseñados para expresar cadenas de IgG de longitud completa. Los constructos de la cadena ligera y de la cadena pesada fueron cotransfectados en células CHO o 293 y los anticuerpos expresados fueron purificados del medio de cultivo sin suero utilizando columna de afinidad de proteínas A. Los anticuerpos purificados fueron sometidos al ensayo ELISA para bloquear la interacción entre DLL4 y Notch1-Fc de rata y al ensayo FACS para unir las líneas celulares estables que expresaban DLL4 murina o DLL4 humana de longitud completa. Para la maduración de afinidad, se construyeron librerías de fagos con tres combinaciones diferentes de bucles de CDR (CDR-L3, -H1 y -H2) derivadas del clon inicial de interés mediante una estrategia de aleatorización flexible, de forma que cada posición seleccionada era mutada a un residuo de tipo no natural o se mantenía como tipo natural en una frecuencia de 50:50 aproximadamente (Liang et al., 2006, above). A continuación, se identificaron los clones de alta afinidad mediante cuatro series de detección en fase de solución frente a proteínas DLL4 marcadas con His, tanto murinas como humanas, en unas condiciones cada vez más restrictivas.

Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos anti-DLL4

Para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-DLL4, se utilizó la medición mediante resonancia plasmón de superficie (SRP) con BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Los biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc) se activaron con clorhidrato de N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), por un corto espacio de tiempo, según las instrucciones del proveedor. Un anticuerpo anti-DLL4 se diluyó con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, a 5 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) del anticuerpo emparejado. A continuación, se inyectó 1M etanolamina para bloquear grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectó el doble de diluciones seriadas de moléculas DLL4-His humanas o murina (de 0,7

nM a 500 nM) en PBS con 0,05% Tween 20 a 25 °C a un caudal de 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon usando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software version 3.2). La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como el cociente k_{off}/k_{on} . Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3. El anticuerpo YW26.81 presentaba valores K_d similares a DLL4 humano y murino (valores K_d de 0,1 nM y 0,09 nM, respectivamente), lo que permitía su evaluación en modelos de ratón.

TABLA 3: Afinidad de unión y cinética de anticuerpos anti-DLL4 a DLL4 humana y murina. "ND" significa que la medición no se ha realizado.

Clon	Delta 4 murino (ECD 5,5)			Delta 4 humano (ECD 5,5)		
	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	K_d (nM)	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	K_d (nM)
YW26	0,57	16	28	0,3	7,4	25
YW26.6	4,1	0,61	0,15	2	0,49	0,25
YW26.14	3,3	0,73	0,22	1,8	0,66	0,37
YW26.20	3,3	1	0,3	1,7	0,79	0,46
YW26.34	3,6	0,65	0,18	1,9	0,67	0,35
YW26.82	5,4	0,46	0,09	2,4	0,37	0,15

Ejemplo 4: Caracterización posterior del anticuerpo anti-DLL4

Mapeo del epítipo del Mab anti-DLL4 YW26.82: El Mab anti-DLL4 26.82 reconoció un determinante de unión presente en la repetición número 2 de EGF-like (EGL2) del dominio extracelular (ECD) de la DLL4 humana. EGL2 comprende los aminoácidos 252-282 del ECD de la DLL4 humana. Los mutantes del ECD de DLL4 se expresaban como proteínas de fusión con fosfatasa alcalina y se unían al anticuerpo como se indicaba. La Figura 11a muestra una representación esquemática de un conjunto de mutantes de DLL4 expresados como proteínas de fusión con fosfatasa alcalina (AP) placentaria humana. Los paréntesis indican secuencias de DLL4 incluidas en las proteínas de fusión. Se llevaron a cabo ensayos de los medios de cultivo condicionados de células 293T que contenían las proteínas de fusión en 96 pocillos de placas de microtitulación recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-DLL4 purificado (YW26.82, 0,5 µg/ml). La DLL4.AP unida se detectó utilizando PNPP en una sola fase (Pierce) como sustrato y una medición de la absorbancia (OD) a 405 nm. El Mab YW26.82 unía constructos que comprendían el dominio EGL2 de DLL4 y no unía un constructo que no tuviera el dominio EGL2 de DLL4. Esto demostraba que el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 YW 26.82 reconocía un epítipo en el dominio EGL2 del ECD de DLL4 humana.

El anticuerpo monoclonal YW26.82 se une selectivamente a DLL4 humana y murina. Se revistieron las placas Nunc MaxiSorp de 96 pocillos con proteínas recombinantes purificadas como se indica (1 µg/ml). La unión de YW26.82 a las concentraciones indicadas se midió utilizando el ensayo ELISA. Los anticuerpos unidos se detectaron con el conjugado de HRP con anticuerpo antihumano usando TMB como sustrato y una lectura de la absorbancia (OD) a 450 nm. Como control durante el ensayo se utilizaron ErbB2-ECD recombinante y anticuerpo anti-HER2 (Figura 11b). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 11b. El anticuerpo monoclonal YW26.82

se unía a DLL4 humana y murina y no se unía de forma detectable a DLL1 humana ni a JAG1 humana. Estos resultados demostraban que el anticuerpo monoclonal YW26.82 se une selectivamente a DLL4.

El análisis FACS de 293 células transfectadas provisionalmente con el vector, DLL4 de longitud completa, Jag1 o DLL1 también demostraba que el anticuerpo monoclonal YW26.82 se unía selectivamente a DLL4. Como se muestra en la Figura 11c, sólo se detectó unión significativa de YW26.82 en células transfectadas con DLL4 (panel superior). No se detectó unión significativa en células transfectadas con Jag1 o DLL1. La expresión de Jag1 y DLL1 se confirmó mediante la unión de Notch1-Fc murino recombinante (rrNotch1-Fc, panel central) y Notch2-Fc murino recombinante (rrNotch2-Fc, panel inferior), respectivamente. Se utilizaron YW26.82, rrNotch1-Fc o rrNotch2-Fc (R&D System) a 2 µg/ml, seguido de IgG-PE antihumana de cabra (1:500, Jackson ImmunoResearch).

Los experimentos de competición demostraron que el anticuerpo monoclonal YW26.82 bloqueaba de forma eficaz y selectiva la interacción de Notch con DLL4, pero no de otros ligandos Notch. Como se muestra en la Figura 11d, el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 bloqueaba la unión de DLL4-AP, pero no de DLL1-AP, a rNotch1 recubierto, con una IC50 calculada de 12 nM aproximadamente (panel izquierdo). El anticuerpo monoclonal anti-DLL4 bloqueaba la unión de DLL4-His, pero no de Jag1-His, a rNotch1 recubierto, con una IC50 calculada de 8 nM aproximadamente (panel derecho).

El anticuerpo monoclonal anti-DLL4 YW26.82 se unía específicamente a DLL4 expresado endógenamente en células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC). Análisis FACS de HUVEC transfectadas con ARNsi específico de DLL4 o control. El YW26.82 se utilizó a 2 µg/ml, seguido de IgG-PE antihumana de cabra (1:500, Jackson ImmunoResearch). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 11e. Se observó unión a HUVEC no transfectadas (control) y a HUVEC transfectadas con ARNsi de un control. En cambio, la unión se reducía significativamente en HUVEC transfectadas con ARNsi de DLL4. Estos experimentos demostraron que el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 YW26.92 se une específicamente a DLL4 expresado endógenamente en HUVEC.

Ejemplo 5: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 aumentaba la proliferación de células endoteliales *in vitro*

Las células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC) cultivadas en geles de fibrina en presencia de células fibroblásticas cutáneas (SF) humanas cocultivadas generan brotes con una distintiva estructura similar al lumen (Nakatsu, M. N. et al., *Microvasc Res* 66, 102-12 (2003)). La adición de anticuerpo anti-DLL4 YW26.92 aumentaba acusadamente la longitud y el número de brotes (Figura 7a). El procesamiento proteolítico de Notch, catalizado por la actividad de la γ -secretasa de un complejo proteínico, es un paso esencial durante la activación de Notch (Baron, M., *Semin Cell Dev Biol* 14, 113-9 (2003)). Conviene señalar que el inhibidor de la γ -secretasa dibenzazepina (DBZ) (van Es, J. H. et al., *Nature* 435, 959-63 (2005); Milano, J. et al., *Toxicol Sci* 82, 341-58 (2004)) tenía el mismo efecto en la formación de brotes de HUVEC. Teniendo en cuenta los mecanismos distintivos de estos dos tratamientos, la mayor formación de brotes se podía atribuir claramente a la atenuación de la señalización de Notch. La tinción con Ki67 reveló que el aumento de la formación de brotes de células endoteliales se debía a la elevada proliferación celular (Fig. 7b). En el ensayo original en gel de fibrina, la formación de brotes de HUVEC y la subsiguiente formación de lumen están favorecidas por células SF cocultivadas. Al sustituir las células SF por medio de cultivo condicionado, tanto el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 como DBZ aún podían aumentar la

formación de brotes de HUVEC (Fig. 1c), lo que favorecía el papel autónomo de las células endoteliales de la señalización de Notch/DLL4. En el experimento inverso, la activación de Notch por la proteína DLL4 inmovilizada ocasionó una inhibición significativa del crecimiento (Fig. 7e). Estos datos indican que el estado de activación de la señalización de Notch/DLL4 está estrechamente asociado a la proliferación de células endoteliales.

5 **Ejemplo 6: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 aumentaba la proliferación de células endoteliales *in vivo***

La retina postnatal temprana de ratones desarrolla un patrón vascular estereotípico en una secuencia de acontecimientos perfectamente definida (Stone, J. & Dreher, Z., *J Comp Neurol* 255, 35-49 (1987); Gerhardt, H. et al., *J Cell Biol* 161, 1163-77 (2003); Fruttiger, M., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 522-7 (2002)). La expresión
10 prominente y dinámica de DLL4 en células endoteliales en crecimiento en las retinas neonatales indican una posible función de la DLL4 en la regulación del desarrollo vascular retiniano (Claxton, S. & Fruttiger, M., *Gene Expr Patterns* 5, 123-7 (2004)). La administración sistémica de YW26.82 causaba una profunda alteración de la vasculatura retiniana. Se producía en la retina una acumulación masiva de células endoteliales, lo que generaba una estructura en forma de hoja con una morfología vascular primitiva (Fig. 7d). Se observó un aumento significativo de
15 la marcación con Ki67 en células endoteliales, lo que indicaba una proliferación elevada de células endoteliales (Fig. 7h). Por lo tanto, este fenotipo hiperproliferativo de las células endoteliales retinianas sobre el bloqueo de DLL4 en ratones neonatales corroboraba los datos obtenidos *in vitro*.

Ejemplo 7: Papel esencial de DLL4/Notch en la regulación de la proliferación de células epiteliales

El VEGF controla varios aspectos fundamentales de las células endoteliales (Ferrara, N. Exs, 209-31 (2005); Coultas,
20 L. et al., *Nature* 438, 937-45 (2005)). Sin embargo, se sabe menos acerca del modo en que la señalización del VEGF se integra en los complejos procesos vasculares, con la diferenciación arteriovenosa (AV) y la organización vascular jerárquica, que evidentemente exigen vías de señalización adicionales muy coordinadas. Los estudios genéticos en el pez cebra indican que el VEGF actúa antes del extremo 5' de la vía del Notch durante la diferenciación endotelial arterial (Lawson, N. D. et al., *Development* 128, 3675-83 (2001)). Observamos que la estimulación de las HUVEC
25 mediante el VEGF ocasionaba un aumento de la expresión de DLL4 en la superficie (datos no incluidos), lo que se correspondía con un informe reciente sobre la regulación ascendente del ARNm de DLL4 mediante la estimulación del VEGF (Patel, N. S. et al., *Cancer Res* 65, 8690-7 (2005)). Curiosamente, DLL4 se regula de forma ascendente tras la activación de Notch (Figura 12), lo que indica un mecanismo de retroalimentación positiva mediante el cual DLL4 transmite eficazmente la señalización del VEGF a la vía de Notch. Las HUVEC fueron estimuladas mediante
30 DLL4 humano marcado con His inmovilizado en el extremo C terminal (aminoácidos 1-404) en ausencia o presencia de DBZ (0,08 μ M). Treinta y seis horas después de la estimulación, se estudió la expresión endógena de DLL4 mediante análisis FACS con anticuerpo anti-DLL4.

Es de destacar que la hiperproliferación de células endoteliales producida por bloqueo de la señalización de Notch seguía dependiendo del VEGF. En el cultivo tridimensional en gel de fibrina, el tratamiento con anticuerpo
35 monoclonal anti-VEGF eliminaba la mayor parte de la formación de brotes de células endoteliales, bien en presencia bien en ausencia de DBZ (Fig. 7f), lo que aumenta la posibilidad de que el comportamiento hiperproliferativo pudiera deberse en parte a una mayor señalización del VEGF. De hecho, el bloqueo de Notch por YW26.82 o DBZ ocasionaba la regulación ascendente del VEGFR2 (Fig. 7g). En cambio, la activación de Notch por DLL4

inmovilizada suprimía la expresión del VEGFR2 (Fig. 7g). Por lo tanto, aunque el VEGF puede actuar antes del extremo 5' de la vía del Notch/DLL4, el Notch/DLL4 puede afinar la respuesta mediante regulación negativa de la expresión del VEGFR2.

Ejemplo 8: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 bloqueaba la diferenciación de células endoteliales y bloqueaba el desarrollo arterial

Además del aumento de la proliferación de células endoteliales, la actuación de Notch/DLL4 como antagonistas causaba un cambio morfológico drástico de los brotes de células endoteliales en gel de fibrina. Las estructuras multicelulares semajantes a lumen estaban, en su mayor parte, ausentes (Fig. 8a), lo que indicaba una diferenciación defectuosa de las células endoteliales. En las retinas tratadas con anticuerpo monoclonal YW26.82, el patrón característico de arterias y venas que se alternaban radialmente se vió alterado gravemente. La tinción con actina anti- α de músculo liso (ASMA), que se asocia a las arterias de la retina, no se detectaba en absoluto (Fig. 8c). Esta observación fue sorprendentemente similar al desarrollo arterial defectuoso en embriones DLL4+/- . Estos datos, desde distintos ángulos, resaltan el papel esencial de DLL4/Notch en la regulación de la diferenciación de células endoteliales.

Ejemplo 9: La expresión de TGF β estaba asociada al estado de activación del Notch

De forma similar a la vía del Notch, la señalización del TGF β depende del contexto y tiene efectos diversos y con frecuencia opuestos sobre la diferenciación, proliferación e inhibición del crecimiento celular. Además, la vía del TGF β interviene en procesos vasculares (Urness, L. D. et al., *Nat Genet* 26, 328-31 (2000); Oshima, M. et al., *Dev Biol* 179, 297-302 (1996); Larsson, J. et al., *Embo J* 20, 1663-73 (2001)). Por ejemplo, la deficiencia de la quinasa 1 similar al receptor de la activina (ALK1), un receptor de tipo I del TGF β específico de células endoteliales, ocasionaba una red primitiva de células endoteliales en los sacos endodérmicos y disfunción arteriovenosa (AVM), un fenotipo compartido por ratones con señalización Notch defectuosa (Urness, L. D. et al., *Nat Genet* 26, 328-31 (2000); Iso, T. et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 543-53 (2003)). Esto nos llevó a investigar la posible relación entre estas dos vías. Observamos que la expresión del TGF β 2 (Fig. 8b) estaba estrechamente asociada al estado de activación de Notch, lo que indica que la vía del TGF β podía actuar después del extremo 3' de la vía del Notch. Juntos, nuestros datos soportan un modelo donde el eje de Notch/DLL4, que sirven como "vías de señalización", integran la señalización del VEGF mediante regulación de la expresión de DLL4 y hacen que la vía del TGF β fomente la diferenciación de las células endoteliales.

Ejemplo 10: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 inhibía el crecimiento tumoral *in vivo*

Para abordar directamente el posible papel de la señalización de Notch/DLL4 durante la angiogénesis tumoral, investigamos el impacto del bloqueo de DLL4 sobre el crecimiento tumoral en modelos tumorales preclínicos (Figuras 9a-d). En modelos tumorales xenotrasplantados Calu6, Colo205 y HM7 (Figuras 9a-c), el tratamiento con YW26.82 se inició tras la determinación del tumor (≥ 250 mm³ de tamaño tumoral). En los tres modelos, se hizo evidente una distinción en la tasa de crecimiento entre los grupos de tratamiento y de control al cabo de tres días de administración. El volumen tumoral del grupo de tratamiento se mantuvo sin cambios durante dos semanas de tratamiento. Además de tumores subcutáneos, el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 también inhibía el crecimiento de tumores en los panículos adiposos mamarios de ratones. En el modelo tumoral MDA-MB-435, el tratamiento se inició 14 días después de la inyección del tumor. A los 6 días de la administración se hizo evidente una

diferencia en las curvas de crecimiento tumoral entre los grupos de tratamiento y de control y se hizo más significativa a medida que avanzaba el tratamiento (Fig. 9d).

También investigamos el impacto del bloqueo de DLL4 y/o VEGF en el crecimiento de numerosos tumores en modelos tumorales preclínicos (Figuras 9e-f; i-p). En los modelos de tumores xenotrasplantados MV-522 y WEHI3, el tratamiento con YW26.82 y/o el tratamiento con anticuerpo anti-VEGF se inició tras el establecimiento del tumor ($\geq 250 \text{ mm}^3$ de tamaño tumoral). En el modelo MV-522, tanto el tratamiento con YW26.82 como el tratamiento con anticuerpo anti-VEGF inhibían el crecimiento tumoral individualmente, pero la combinación de ambos tratamientos era más eficaz. En el modelo WEHI3, el tratamiento con anticuerpo anti-VEGF no mostraba efecto alguno sobre el crecimiento tumoral, mientras que el tratamiento con YW26.82 mostraba una inhibición significativa del crecimiento tumoral. En los modelos SK-OV-3X1, LL2, EL4, H1299, SKMES-1, MX-1, SW620 y LS174T, el tratamiento con YW26.82 (5 mg/kg, i.p., dos veces por semana) y/o el tratamiento con anticuerpo anti-VEGF (5 mg/kg, i.p., dos veces por semana) se administraban tras el establecimiento de los tumores. En cada uno de estos modelos, el tratamiento con YW26.82 inhibía sólo el crecimiento tumoral. Además, en todos estos modelos en los que se probó la combinación, YW26.82 presentaba una mayor eficacia en combinación con anticuerpo anti-VEGF.

Ejemplo 11: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 aumentaba la proliferación de células endoteliales tumorales

A la luz de la inhibición del crecimiento tumoral, utilizamos el modelo tumoral de linfoma de ratón EL4 para estudios de histología vascular. Observamos que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-DLL4 ocasionaba un aumento espectacular de la densidad de células endoteliales (Fig. 9g). En cambio, el anticuerpo anti-VEGF tenía un efecto completamente opuesto (Fig. 9g), aunque los dos tratamientos presentaban una eficacia similar en este modelo.

Ejemplo 12: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 inhibía la perfusión vascular tumoral

Como el bloqueo in vitro de la vía del Notch/DLL4 obstaculizaba la formación de una estructura similar al lumen por las células endoteliales (Fig. 8a), se investigó si el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-DLL4 ocasionaba un defecto similar en la vasculatura tumoral y afectaba al flujo sanguíneo correcto. La perfusión sistémica con FITC-letina reveló que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-DLL4 ocasionaba una acusada reducción del marcado con lectina de los vasos del tumor (Fig. 9h). Cabe destacar que se ha demostrado que la disfunción arteriovenosa en ratones con déficit de ALK1 causa una circulación sanguínea anómala (Urness, L. D. et al., *Nat Genet* 26, 328-31 (2000)). Dado el papel esencial de la señalización de Notch/DLL4 en la diferenciación AV, tanto en embriones como las retinas postnatales, el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 podría influir la especificación celular de las células endoteliales tumorales y originar un flujo sanguíneo direccional defectuoso. De hecho, en tumores Colo205 tratados con anticuerpo monoclonal anti-DLL4, había regiones donde una densidad elevada de células endoteliales se asociaba a un bajo contenido de células tumorales viables, lo que supone una mala función vascular. Es preciso realizar otros estudios que utilicen técnicas para captación de imágenes vasculares para averiguar los defectos vasculares con precisión.

Ejemplo 13: El DLL4/Notch no es importante para la homeostasis del intestino de ratón.

Una gran preocupación sobre la inhibición global del Notch es que puede ser nociva, dadas las funciones pleiotrópicas de la señalización de Notch en la regulación de la homeostasis de sistemas de autorenovación

posnatales. Por ejemplo, la señalización del Notch es necesaria para mantener células progenitoras en las criptas no diferenciadas en los intestinos (van Es, J. H. et al., *Nature* 435, 959-63 (2005); Fre, S. et al., *Nature* 435, 964-8 (2005)). De hecho, los inhibidores de la γ -secretasa, que bloquearían indiscriminadamente todas las actividades Notch, causan efectos secundarios no deseados debido a un aumento masivo de las células calciformes dentro del compartimento de las criptas (Milano, J. et al., *Toxicol Sci* 82, 341-58 (2004); Wong, G. T. et al., *J Biol Chem* 279, 12876-82 (2004)). Examinamos los intestinos delgados de ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-DLL4 mediante análisis inmunohistoquímico. A diferencia del tratamiento con DBZ, no se observaron diferencias en los perfiles de proliferación o diferenciación celular de las criptas epiteliales entre los grupos de control y de tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-DLL4 tras seis semanas de tratamiento (Fig. 10). Además, el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 no alteraba la expresión del gen diana del Notch HES-1 en la población de amplificación del tránsito (TA) que se dividía rápidamente (Fig. 10). Estos resultados apoyan la idea de que la señalización de Notch/DLL4 está limitada en gran parte al sistema vascular.

Ejemplo 14: El tratamiento con anticuerpo anti-DLL4 no influye en la vasculatura de la retina adulta

Aunque el bloqueo de DLL4 tenía un profundo impacto en el desarrollo vascular de la retina del ratón neonato, la administración de anticuerpo anti-DLL4 no tenía impacto visible en la vasculatura de la retina adulta (Fig. 8d). Por ello, la señalización de Notch/DLL4 es esencial durante la angiogénesis activa, pero desempeña un papel de menor importancia en el mantenimiento normal de los vasos. Según esto, durante el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-DLL4, no se observó pérdida de peso visible o muerte de animales en ratones portadores de tumores cuando se les administraban 10 mg/kg dos veces por semana durante un máximo de 8 semanas. En modelos tumorales, el anticuerpo monoclonal anti-DLL4 y el anticuerpo anti-VEGF muestran efectos contrarios sobre la vasculatura del tumor, lo que indica la existencia de mecanismos de acción que no se solapan.

Aunque la anterior invención se ha descrito en detalle a modo de ejemplo a efectos de claridad y comprensión, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar de forma que limiten el ámbito de la invención.

LAS REIVINDICACIONES SON:

1. Un anticuerpo anti-DLL4 aislado que comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de la región hipervariable (HVR) seleccionadas en el grupo formado por:

5 (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, donde A1-A11 es RASQDVSTAVA (identificador de secuencia n.º: 10)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es SASFLYS (identificador de secuencia n.º: 11)

10 (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQSYTGTVT (identificador de secuencia n.º: 18)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GFTFTDNWIS (identificador de secuencia n.º: 1);

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GYISPNSGFTYYADSVKG (identificador de secuencia n.º: 8) y

15 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F15, donde F1-F15 es VYYCARDNFGGYFDY (identificador de secuencia n.º: 9); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la secuencia de la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia n.º: 1-18.

20 2. Un anticuerpo anti-DLL4 aislado que comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de la región hipervariable (HVR) seleccionadas en el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, donde A1-A11 es RASQDVSTAVA (identificador de secuencia n.º: 10)

25 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es SASFLYS (identificador de secuencia n.º: 11)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es QQSYNGPST (identificador de secuencia n.º: 15)

30 (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GFTFTDNWIS (identificador de secuencia n.º: 1)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GVINPNSGATEYADSVKG (identificador de secuencia n.º: 5) y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F15, donde F1-F15 es VYYCARDNFGGYFDY (identificador de secuencia n.º: 9); y

35 (b) al menos una variante de la HVR, donde la secuencia de la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia n.º: 1-18.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, donde una variante de la HVR-L3 comprende de 1 a 6 (1, 2, 3, 4, 5 ó 6) sustituciones en cualquier combinación de las posiciones siguientes: 91 (S o W), 92 (Y o F), 93 (T, N o S), 94 (T o G), 95 (P, Q, A o T), y/o 96 (P, S, A o V).

5 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, donde una variante de la HVR-H2 comprende de 1 a 4 (1, 2, 3 ó 4) sustituciones en cualquier combinación de las posiciones siguientes: 50 (V, L o Y), 52 (N o S), 52a (P o S) o 53 (N, Q, T o I).

10 5. Un anticuerpo anti-DLL4 aislado que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR, donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada entre el grupo formado por los identificadores de secuencia núms: 1-18, y donde el identificador de secuencia n.º 10 se corresponde con una HVR-L1; el identificador de secuencia n.º 11 se corresponde con una HVR-L2; los identificadores de secuencia n.º 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 se corresponden con una HVR-L3; los identificadores de secuencia n.º 1 ó 2 se corresponden con una HVR-H1; los identificadores de secuencia n.º 3, 4, 5, 6, 7 u 8 se corresponden con una HVR-H2; y el
15 identificador de secuencia n.º 9 se corresponde con una HVR-H3.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia n.º: 10, 11, 14, 2, 3, 9.
20

7. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia n.º: 10, 11, 15, 1, 5, 9.

25 8. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia n.º: 10, 11, 16, 1, 6, 9.

9. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia n.º: 10, 11, 17, 1, 7, 9.
30

10. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia n.º: 10, 11, 18, 1, 8 y 9.
35

11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde al menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura de consenso humana.

12. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, donde la modificación es sustitución, inserción o eliminación.
13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el anticuerpo comprende una secuencia
5 de estructura de consenso del subgrupo κ humano.
14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el anticuerpo comprende una secuencia de estructura de consenso del subgrupo III humano de la cadena pesada.
- 10 15. El anticuerpo de la reivindicación 14, donde el anticuerpo comprende una sustitución de una o más de las posiciones 71, 73 ó 78.
16. El anticuerpo de la reivindicación 15, donde la sustitución es una o más de R71A, N73T o N78A.
- 15 17. Un polinucleótido que codifique un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
18. Un vector que comprenda el polinucleótido de la reivindicación 17.
19. El vector de la reivindicación 18, donde el vector es un vector de expresión.
- 20 20. Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 18 ó 19.
21. La célula huésped de la reivindicación 20, donde la célula huésped es procariótica.
- 25 22. La célula huésped de la reivindicación 20, donde la célula huésped es eucariótica.
23. La célula huésped de la reivindicación 20, donde la célula huésped es de mamífero.
24. Un método para elaborar un anticuerpo anti-DLL4, que comprenda (a) la expresión de un vector de la
30 reivindicación 19 en una célula huésped apta y (b) la recuperación del anticuerpo.
25. Un método para elaborar un inmunoconjugado anti-DLL4, que comprenda (a) la expresión de un vector de la reivindicación 19 en una célula huésped apta y (b) la recuperación del anticuerpo.
- 35 26. El método de la reivindicación 24 ó 25, donde la célula huésped es procariótica.
27. El método de la reivindicación 24 ó 25, donde la célula huésped es eucariótica.

28. Un método para la detección de DLL4, que comprenda la detección del complejo DLL4- anticuerpo anti-DLL4 en una muestra biológica.

29. Un método para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión de DLL4, que incluya la detección del complejo formado por DLL4 y anticuerpos anti-DLL4 en una muestra biológica procedente de un paciente que tenga o posiblemente tenga el trastorno.

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28-29, donde el anticuerpo anti-DLL4 se detecta mediante marcado.

31. Una composición que comprende un anticuerpo anti-DLL4 de cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

32. Una composición que comprende un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 17-19.

33. La composición de la reivindicación 31 ó 32, donde la composición comprende además una molécula vehículo.

34. Un método para el tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno de proliferación celular que comprenda la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 a un sujeto que necesite dicho tratamiento, mediante el cual se trata el tumor, el cáncer o el trastorno de proliferación celular.

35. El método de la reivindicación 34, donde el tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular es cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de mama.

36. El método de la reivindicación 34 ó 35, que comprende, además, la administración de una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico.

37. El método de la reivindicación 36, donde el agente antiangiogénico es un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

38. El método de la reivindicación 37, donde el antagonista del VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

39. El método de la reivindicación 38, donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-39, que supone administrar también una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

41. Un método para mejorar la eficacia de un agente antiangiogénico en un sujeto con un proceso patológico asociado a angiogénesis, que supone la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 además del agente antiangiogénico, lo que aumenta la eficacia de dicho agente antiangiogénico.

5

42. El método de la reivindicación 41, en la que el proceso patológico asociado a angiogénia es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

43. El método de la reivindicación 41, donde el proceso patológico asociado a angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

10

Clon n.º	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
152.26	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.6	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.14	G	F	S	F	R	D	N	W	I	S
152.26.20	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.34	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.40	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S
152.26.82	G	F	T	F	T	D	N	W	I	S

Clon n.º	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
152.26	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.6	G	L	I	N	P	Q	S	G	S	S	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.14	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.20	G	V	I	N	P	N	S	G	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.34	G	L	I	N	P	T	S	G	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.40	G	V	I	N	S	I	S	G	A	T	A	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.82	G	Y	I	S	P	N	S	G	F	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

Clon n.º	H3															
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	M	101	102	
152.26	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.6	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.14	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.20	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.34	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.40	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.82	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	

Clon n.º	L1											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
152.26	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
152.26.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
152.26.14	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
152.26.20	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
152.26.34	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
152.26.40	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
152.26.82	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	

FIG. 1a

Clon n.º	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
152.26	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.6	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.14	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.20	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.34	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.40	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.82	S	A	S	F	L	Y	S

Clon n.º	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
152.26	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
152.26.6	Q	Q	S	Y	T	G	Q	S	T
152.26.14	Q	Q	S	V	N	G	P	A	T
152.26.20	Q	Q	S	Y	N	G	P	S	T
152.26.34	Q	Q	S	Y	T	G	P	S	T
152.26.40	Q	Q	W	F	S	T	A	P	T
152.26.82	Q	Q	S	Y	T	G	T	V	T

FIG. 1b

I					
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	
II					
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
III					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Aceptor					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Segundo aceptor					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	

FIG. 2a

I						
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 19	
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 20	
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 21	
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 22	
II						
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 23	
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 24	
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCA	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 25	
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYC	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 26	
III						
A	RFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 27
B	RFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 28
C	RFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 29
D	RFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 30
Aceptor						
A	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCSR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 31
B	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCSR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 32
C	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCS	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 33
Segundo aceptor						
A	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 34
B	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 35
C	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 36
D	RFTISRDN	SKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3- WGQGT	TLVTVSS	SEQ ID NO.: 37

FIG. 2b

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK ID. SEC. N.º: 38
EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK ID. SEC. N.º: 39
EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK ID. SEC. N.º: 40
EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK ID. SEC. N.º: 41

5 / 24

P2336R1

FIG. 3

Secuencias de estructura de la cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (ID. SEC. N°: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(ID. SEC. N°: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁶⁸
(ID. SEC. N°: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (ID. SEC. N°: 45)

Secuencias de estructura de la cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (ID. SEC. N°: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(ID. SEC. N°: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{82a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(ID. SEC. N°: 48)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (ID. SEC. N°: 49)

FIG. 4Secuencias de estructura de la cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 (subrayado)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (ID. SEC. N°: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(ID. SEC. N°: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁶⁸
(ID. SEC. N°: 50)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (ID. SEC. N°: 45)

Secuencias de estructura de la cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayado)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (ID. SEC. N°: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(ID. SEC. N°: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (ID. SEC. N°: 51)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (ID. SEC. N°: 49)

FIG. 5

Clon 26.20

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGATEYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (ID. SEC. N°: 54)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYNGPSTFGQGTKVEIKR (ID. SEC. N°: 55)

Clon 26.14

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFRDNWISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGSTDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (ID. SEC. N°: 56)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSVNGPATFGQGTKVEIKR (ID. SEC. N°: 57)

Clon 26.82

VH

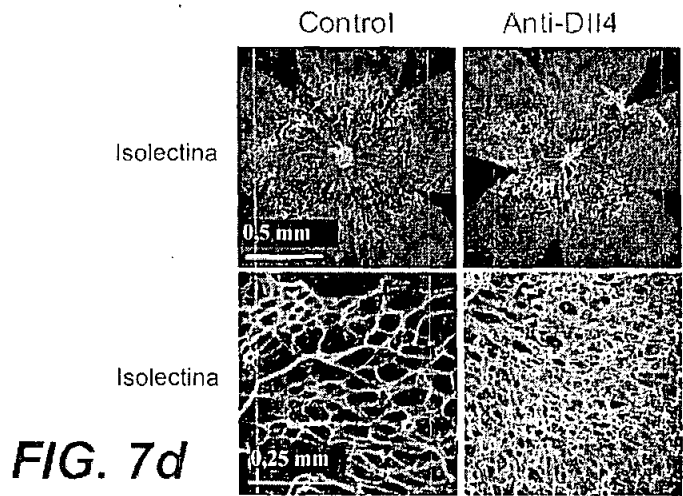
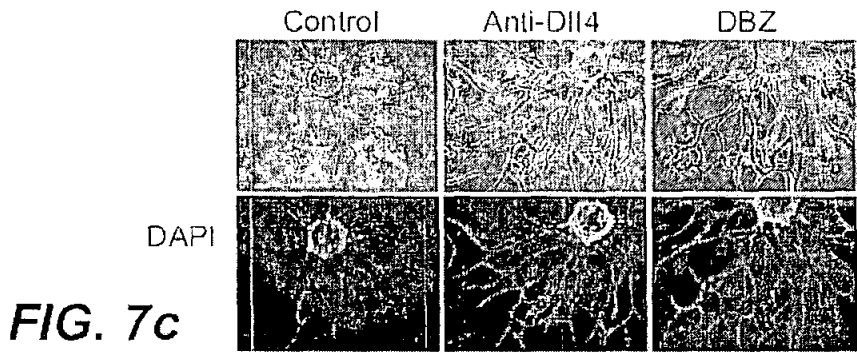
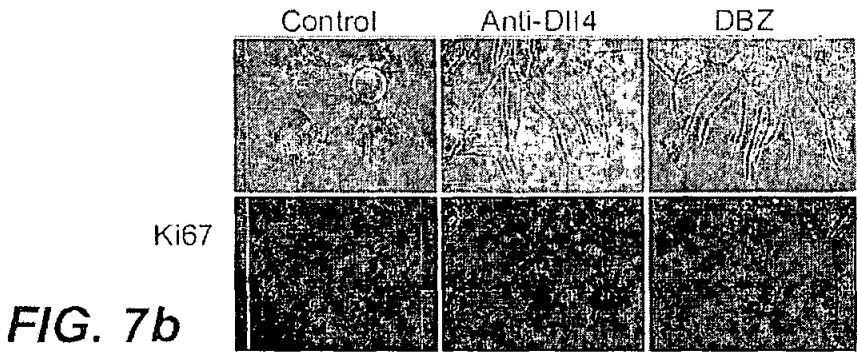
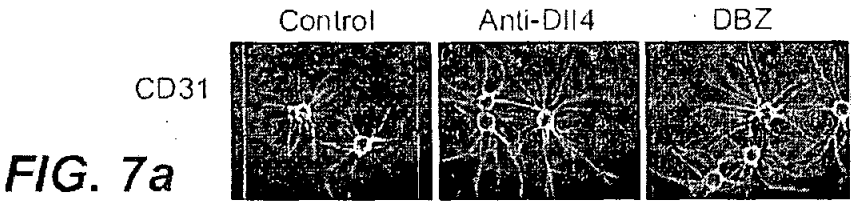
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLV (ID. SEC. N°: 58)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR (ID. SEC. N°: 59)

FIG. 6

8 / 24



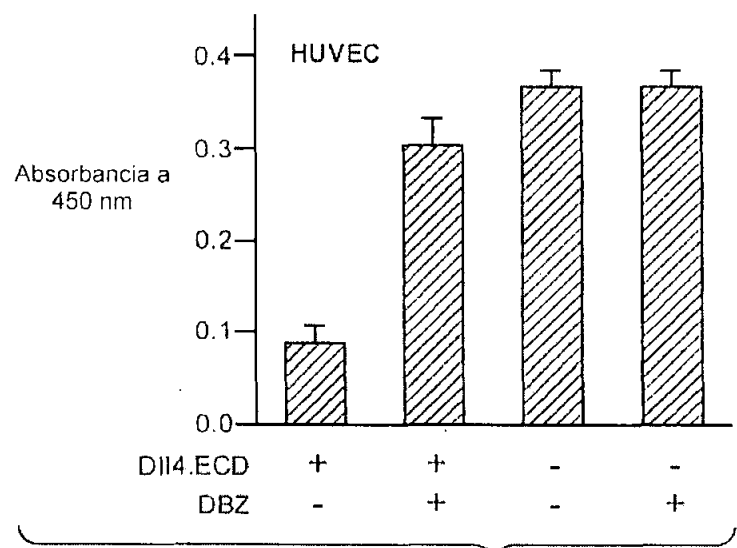


FIG. 7e

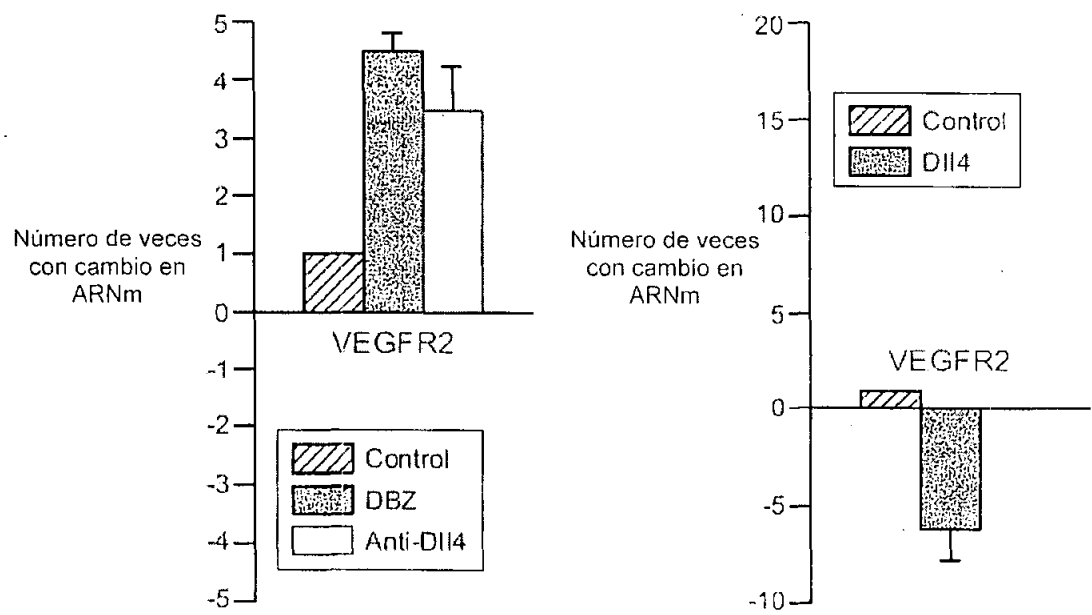


FIG. 7g

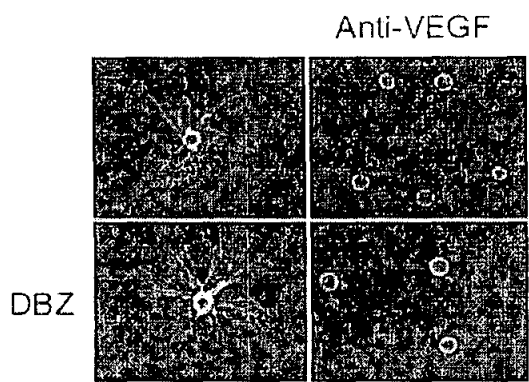


FIG. 7f

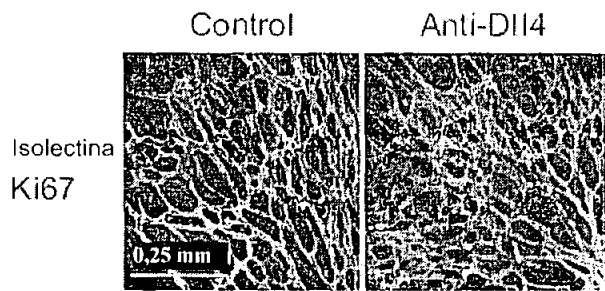


FIG. 7h

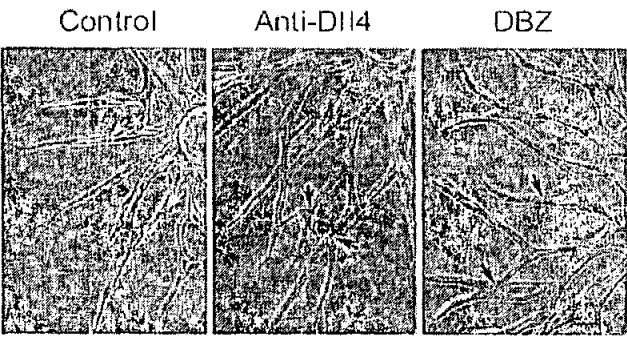


FIG. 8a

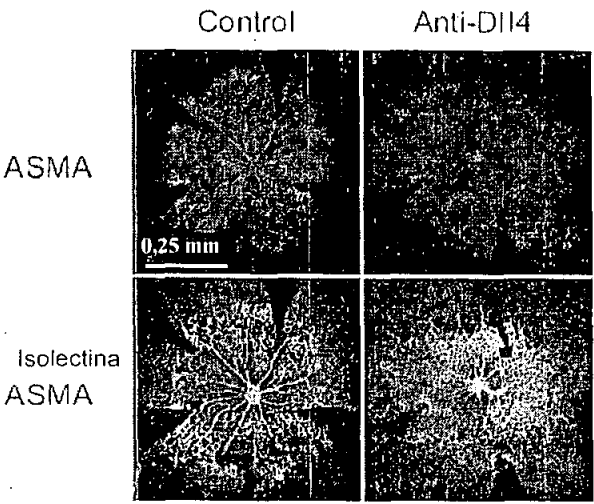


FIG. 8c

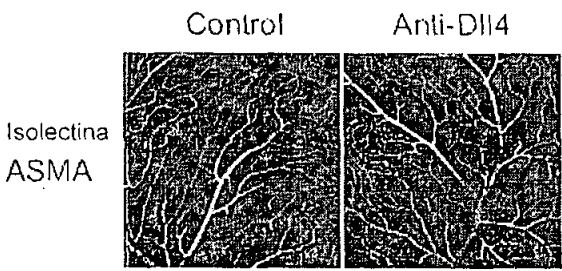


FIG. 8d

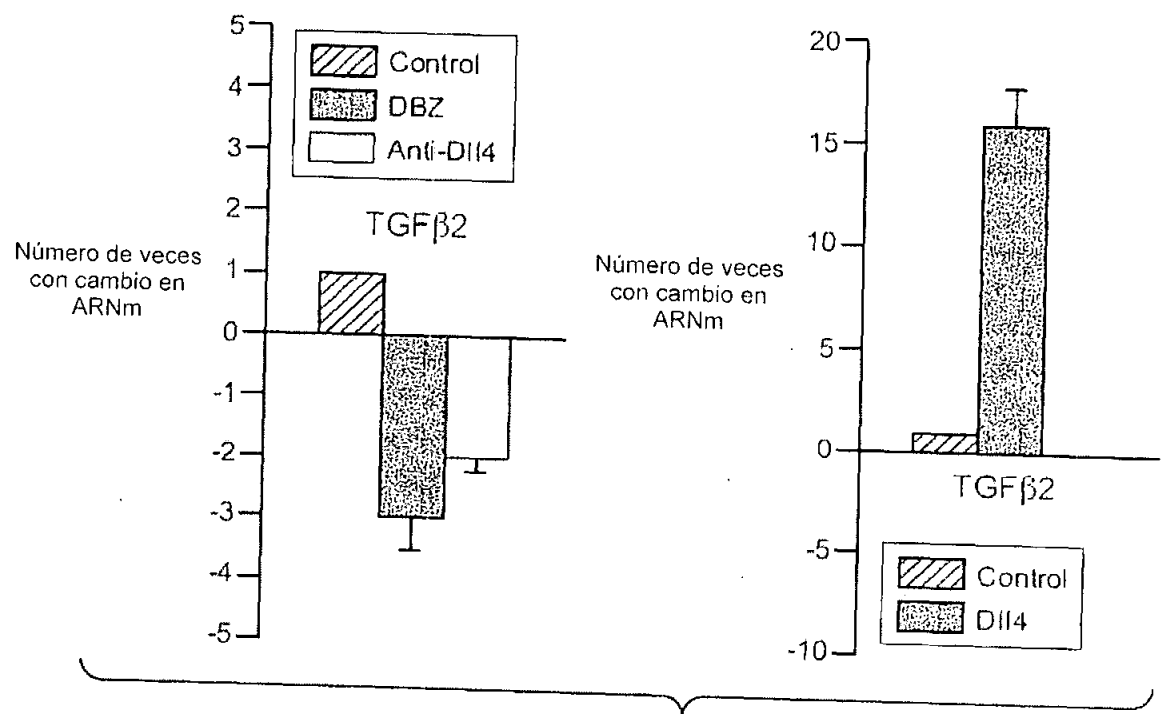
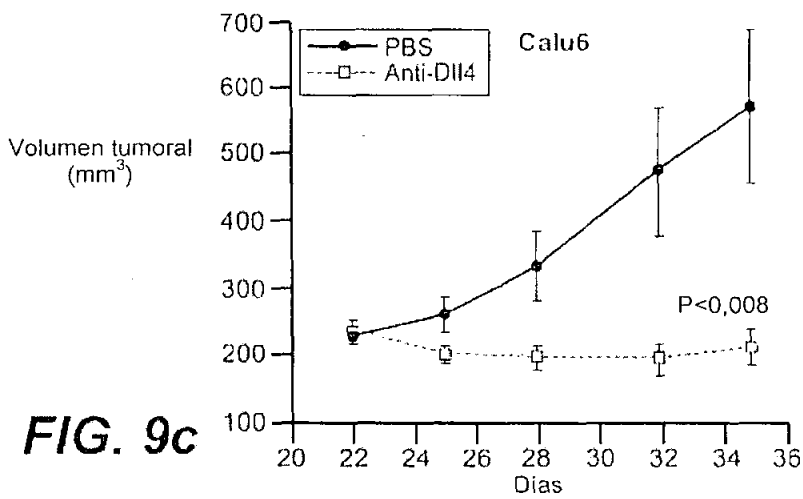
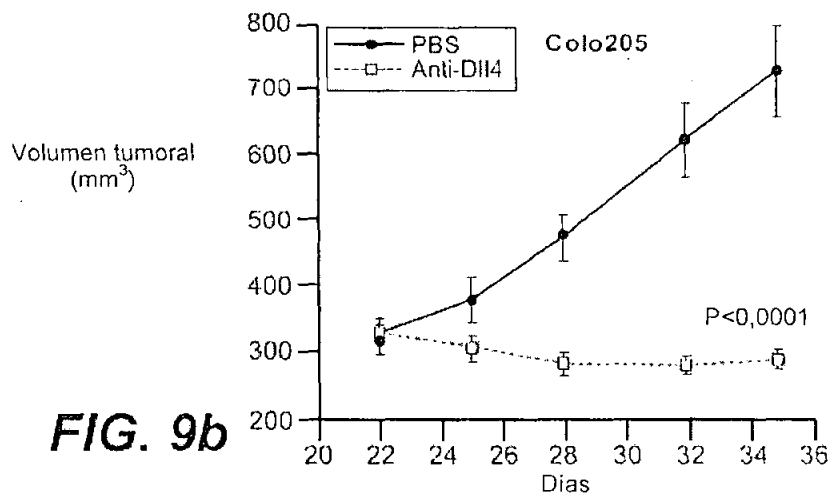
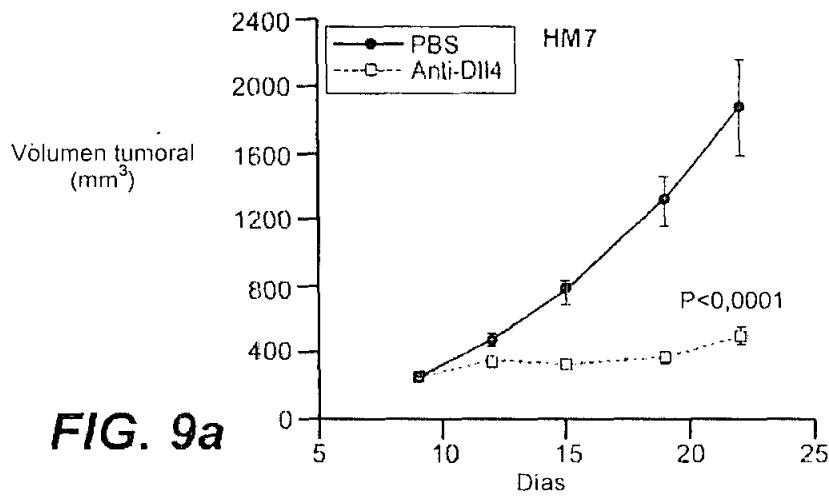


FIG. 8b



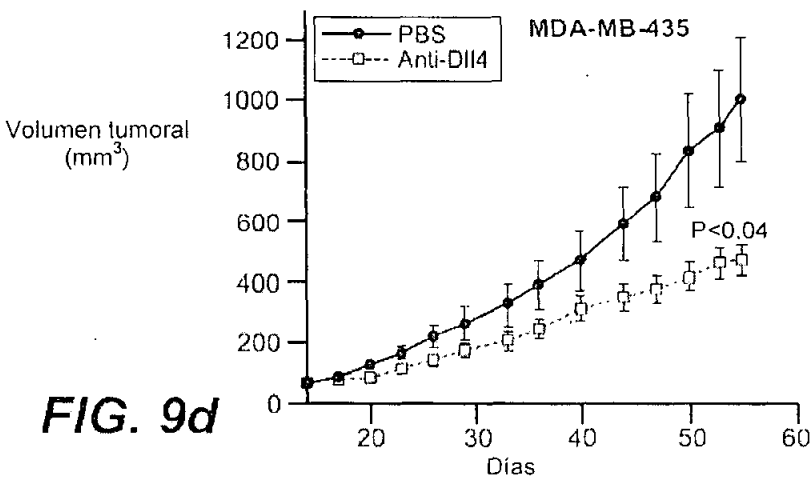


FIG. 9d

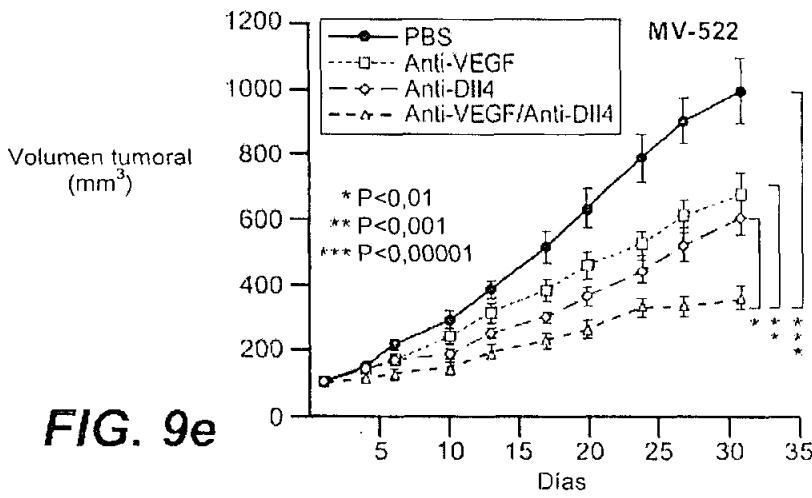


FIG. 9e

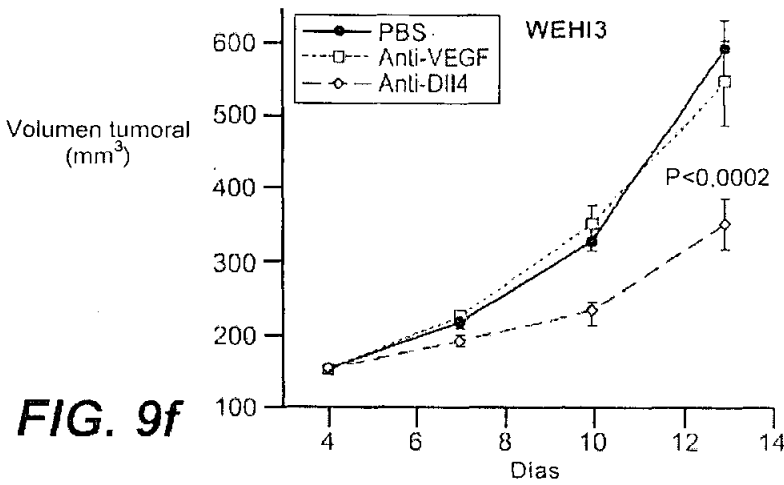


FIG. 9f

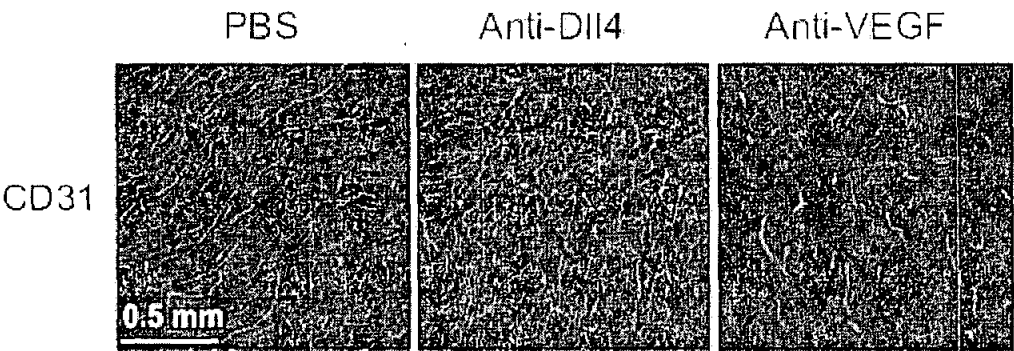


FIG. 9g

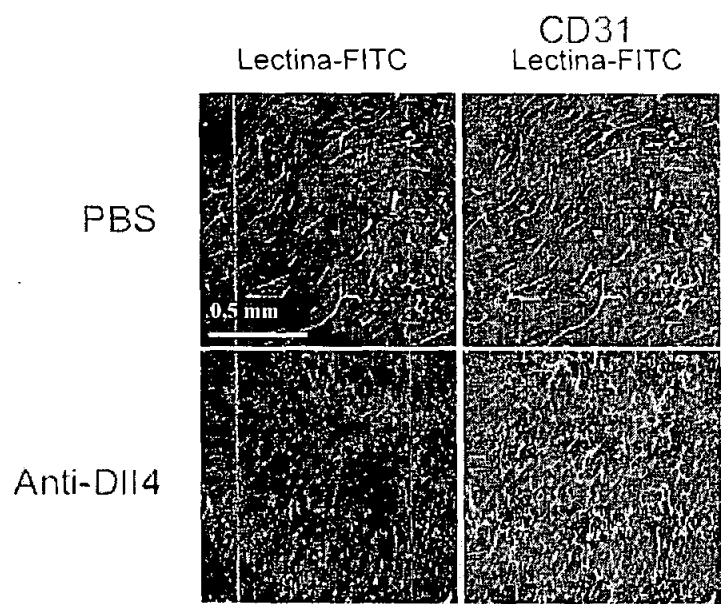


FIG. 9h

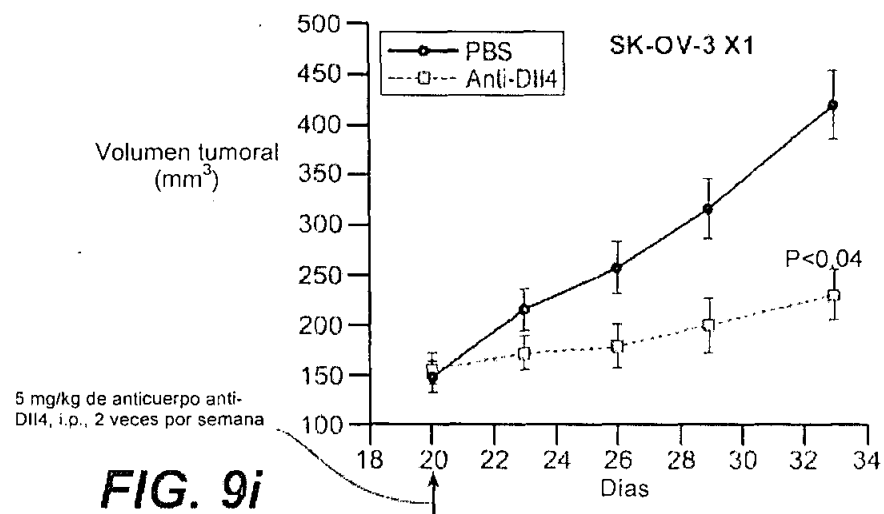


FIG. 9i

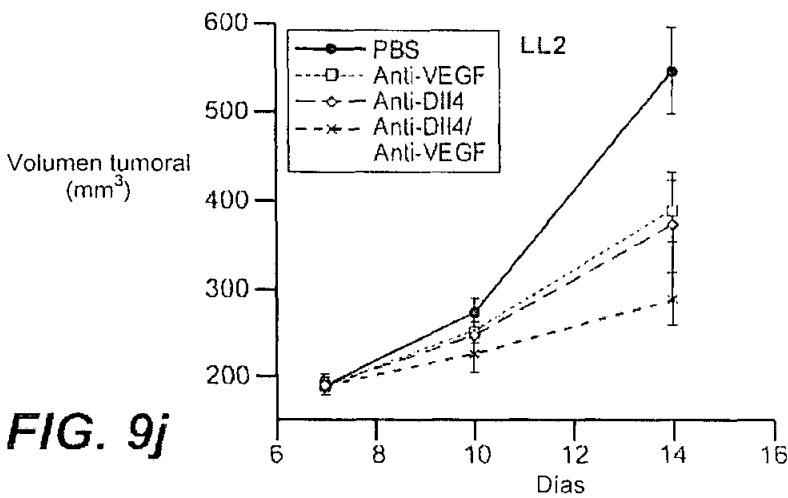


FIG. 9j

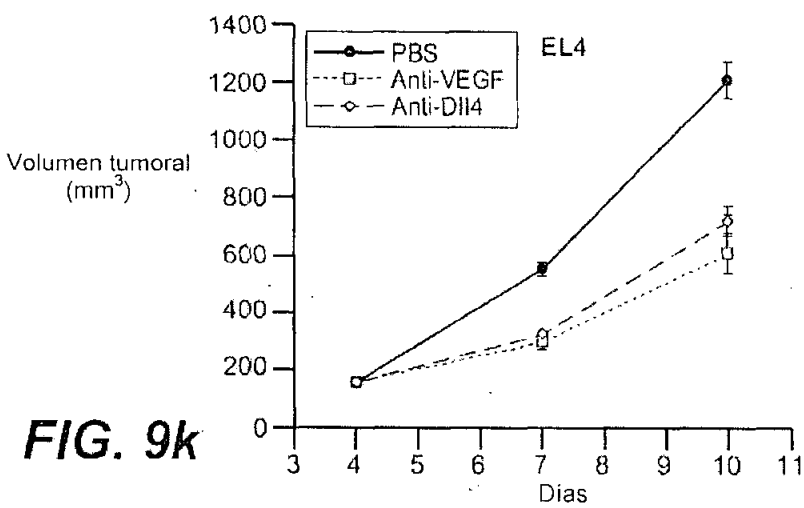


FIG. 9k

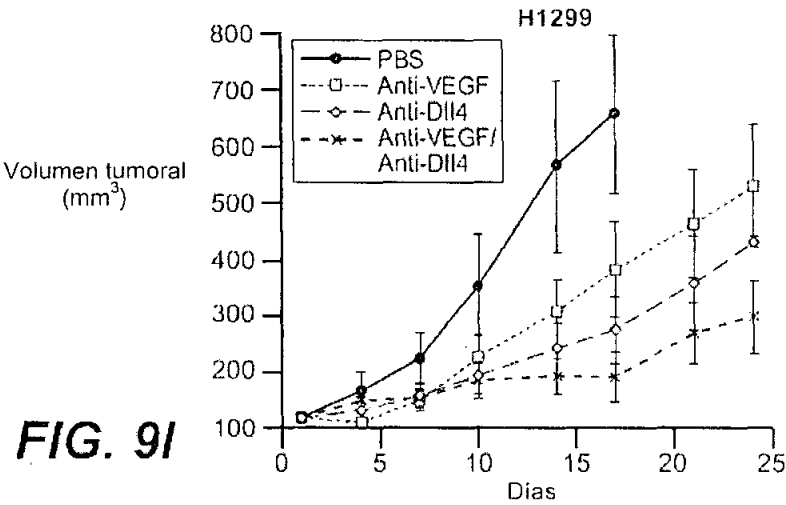


FIG. 9l

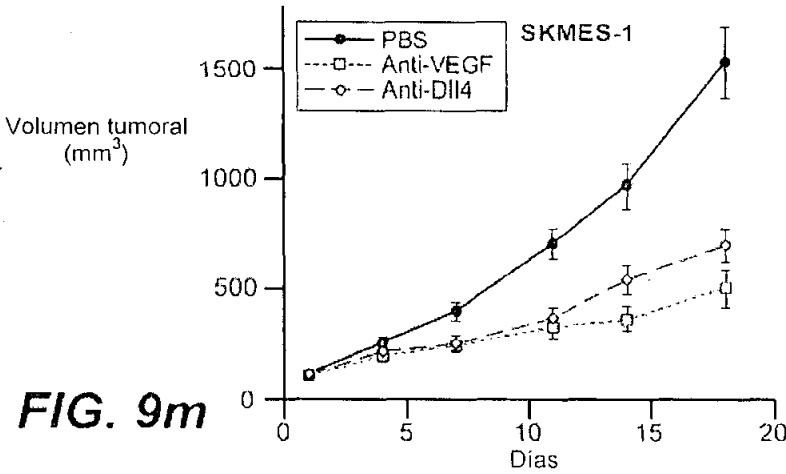


FIG. 9m

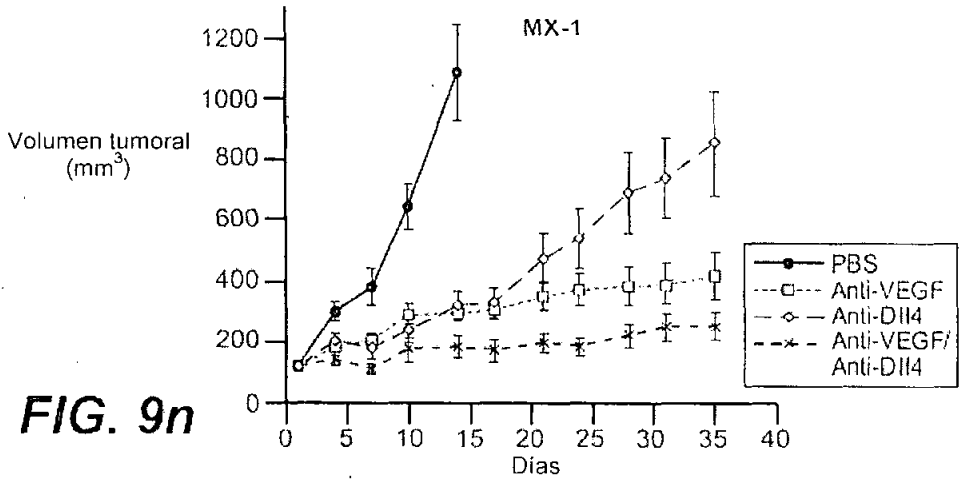
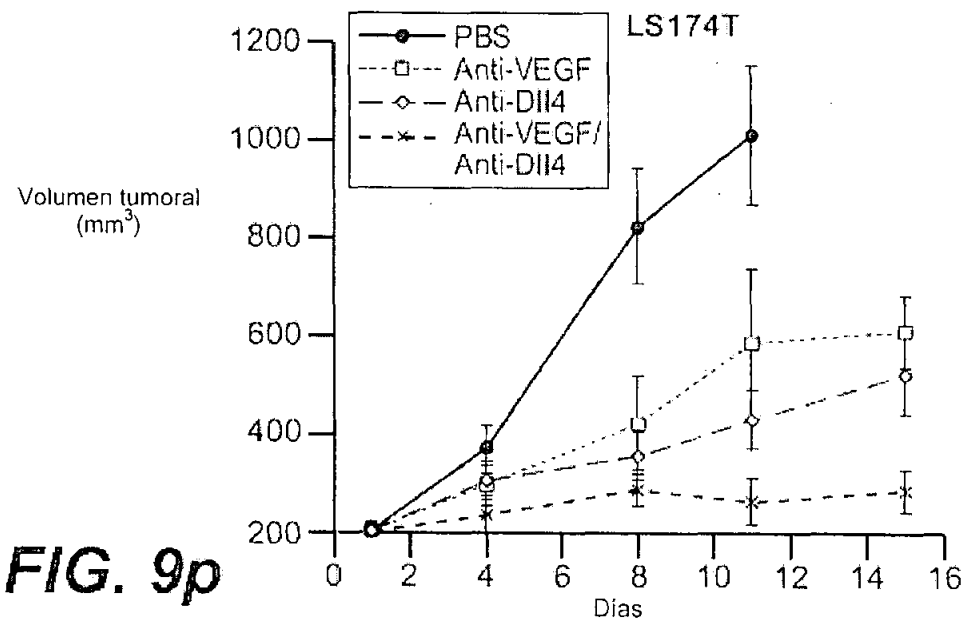
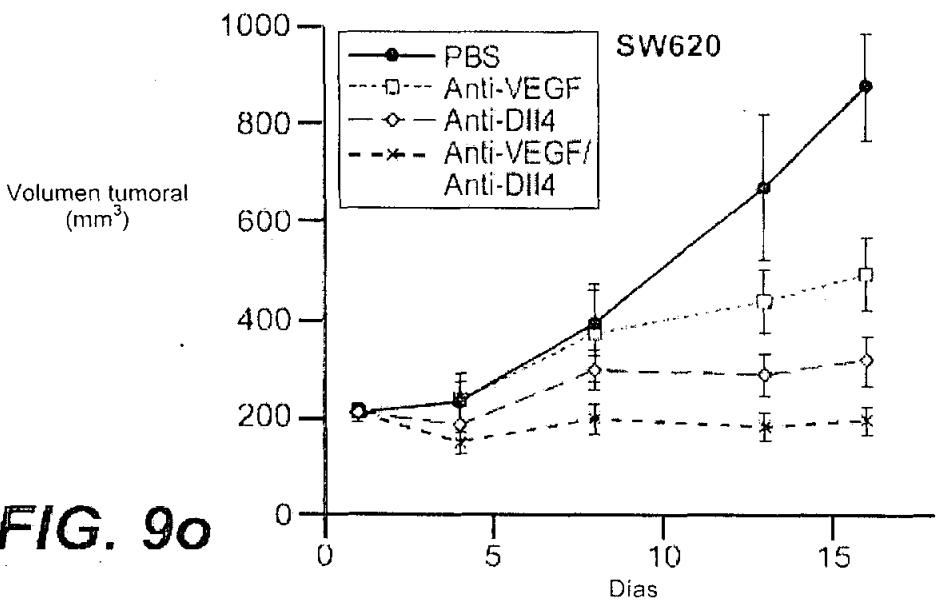


FIG. 9n



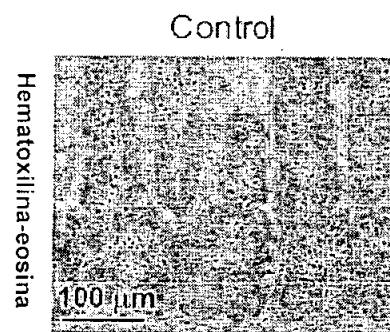


FIG. 10a

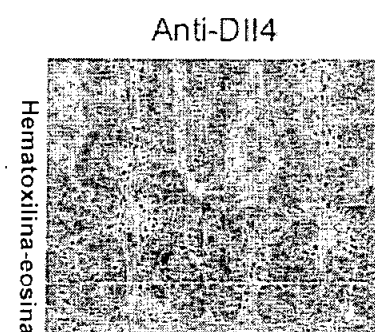


FIG. 10b

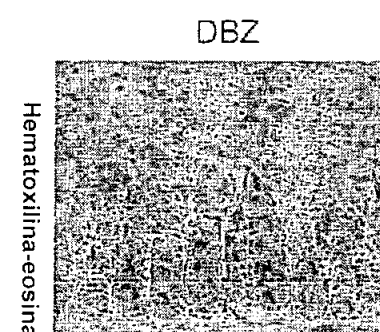


FIG. 10c

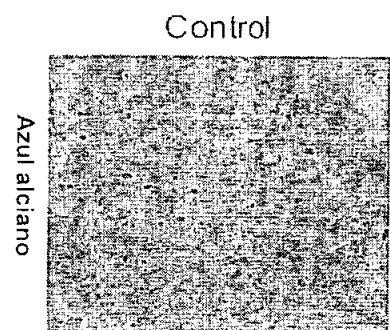


FIG. 10d

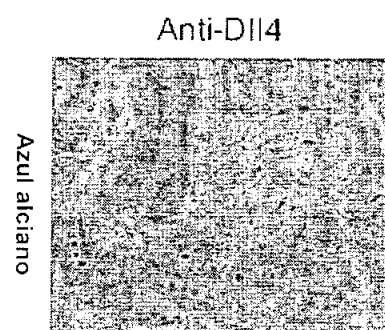


FIG. 10e

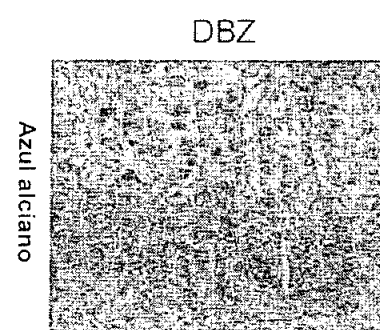
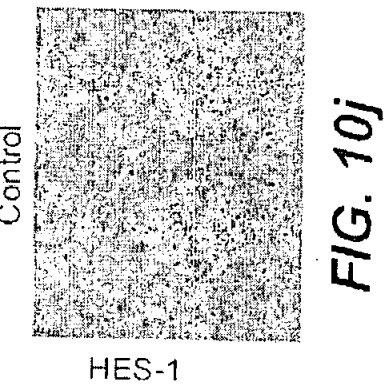
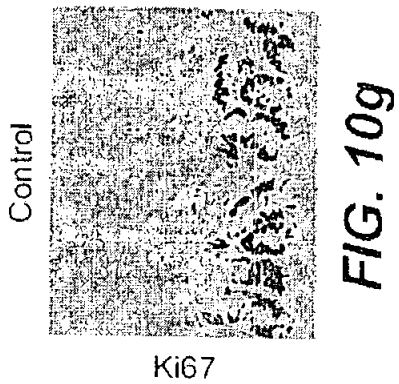
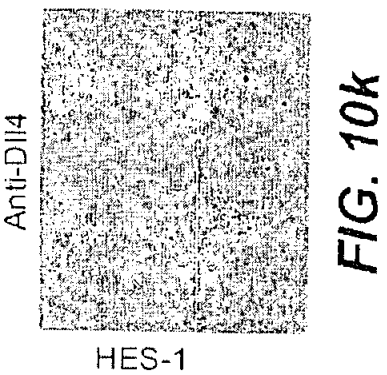
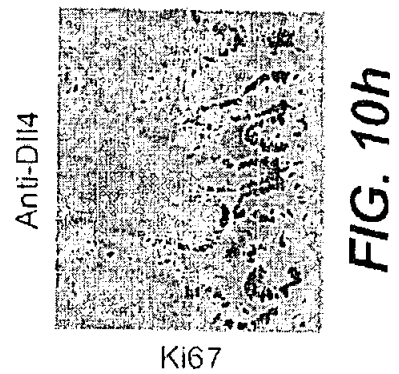
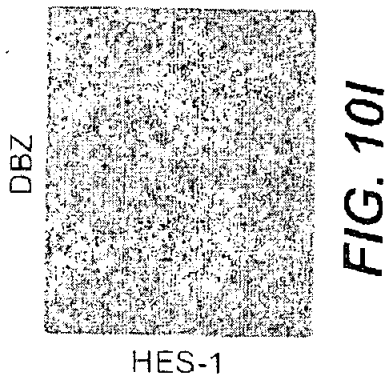
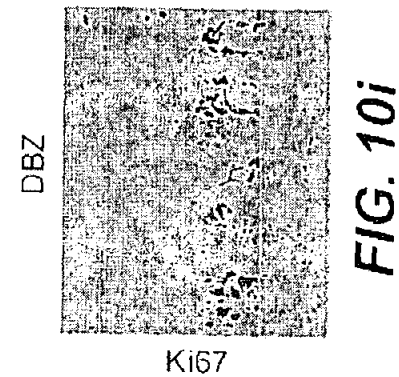


FIG. 10f

300



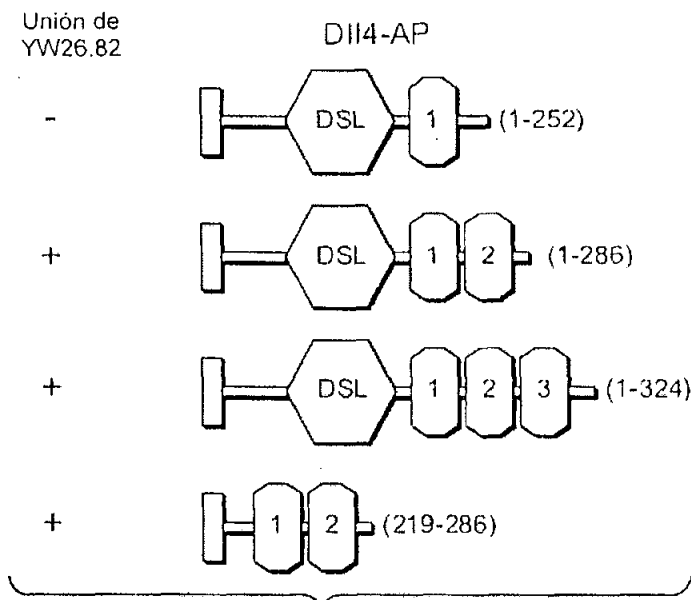


FIG. 11a

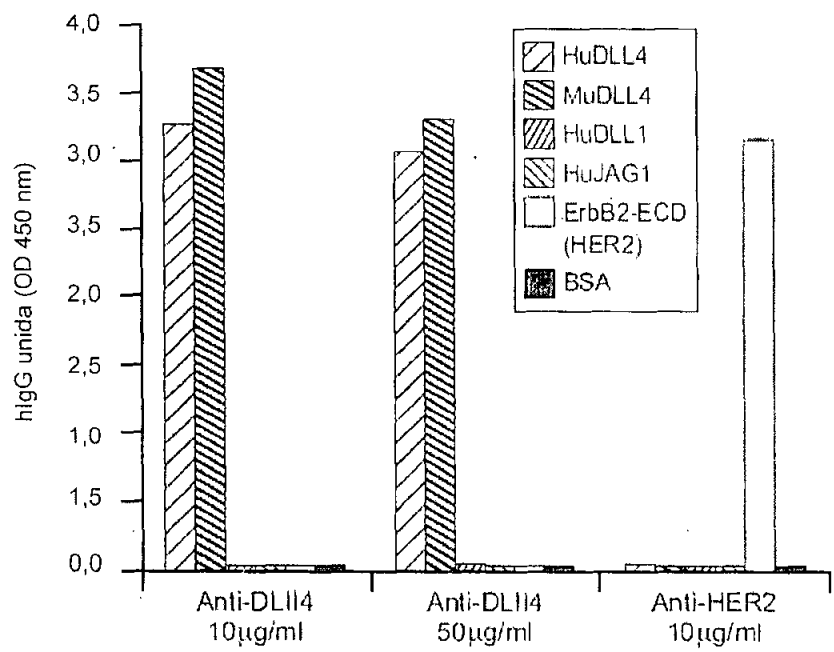


FIG. 11b

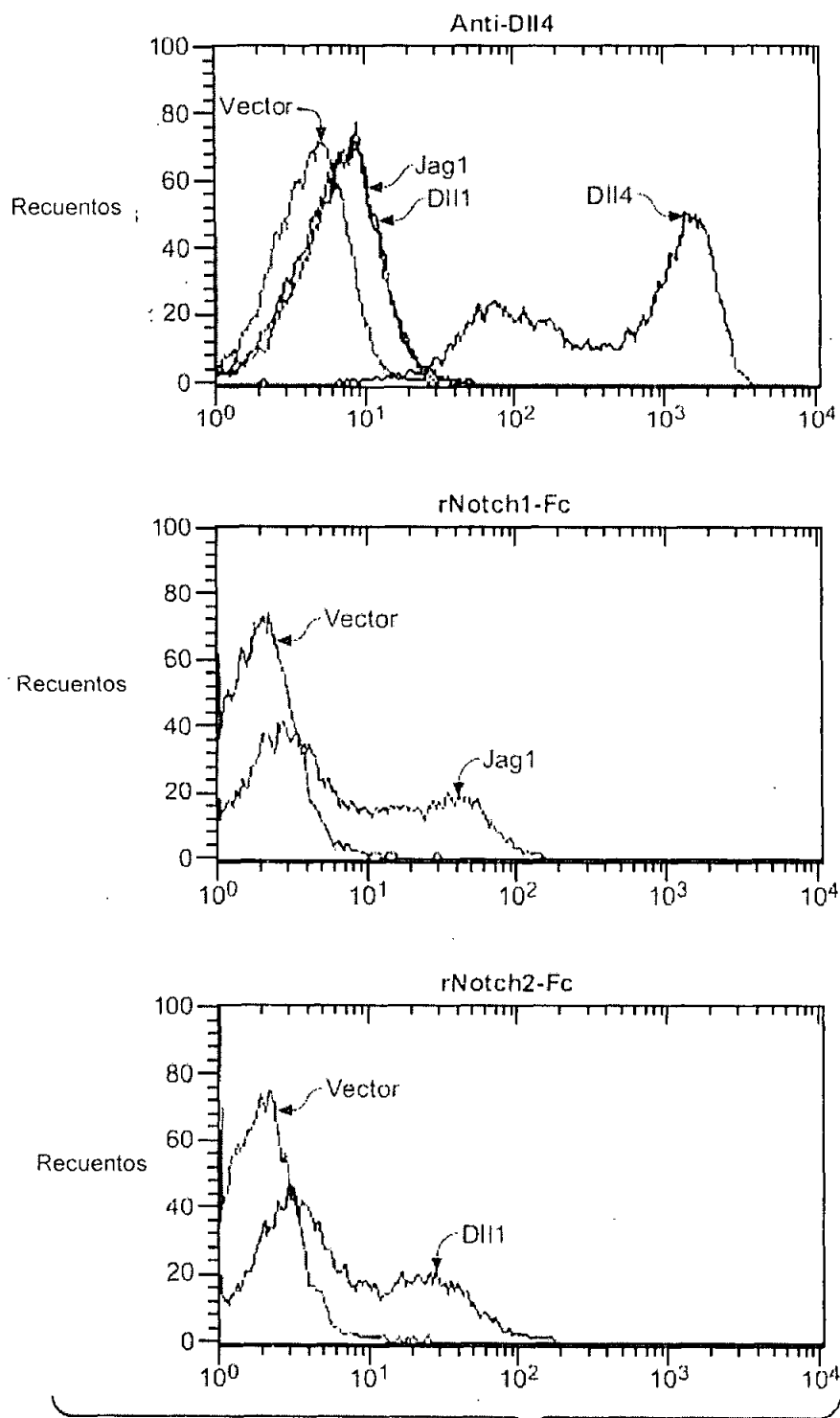


FIG. 11c

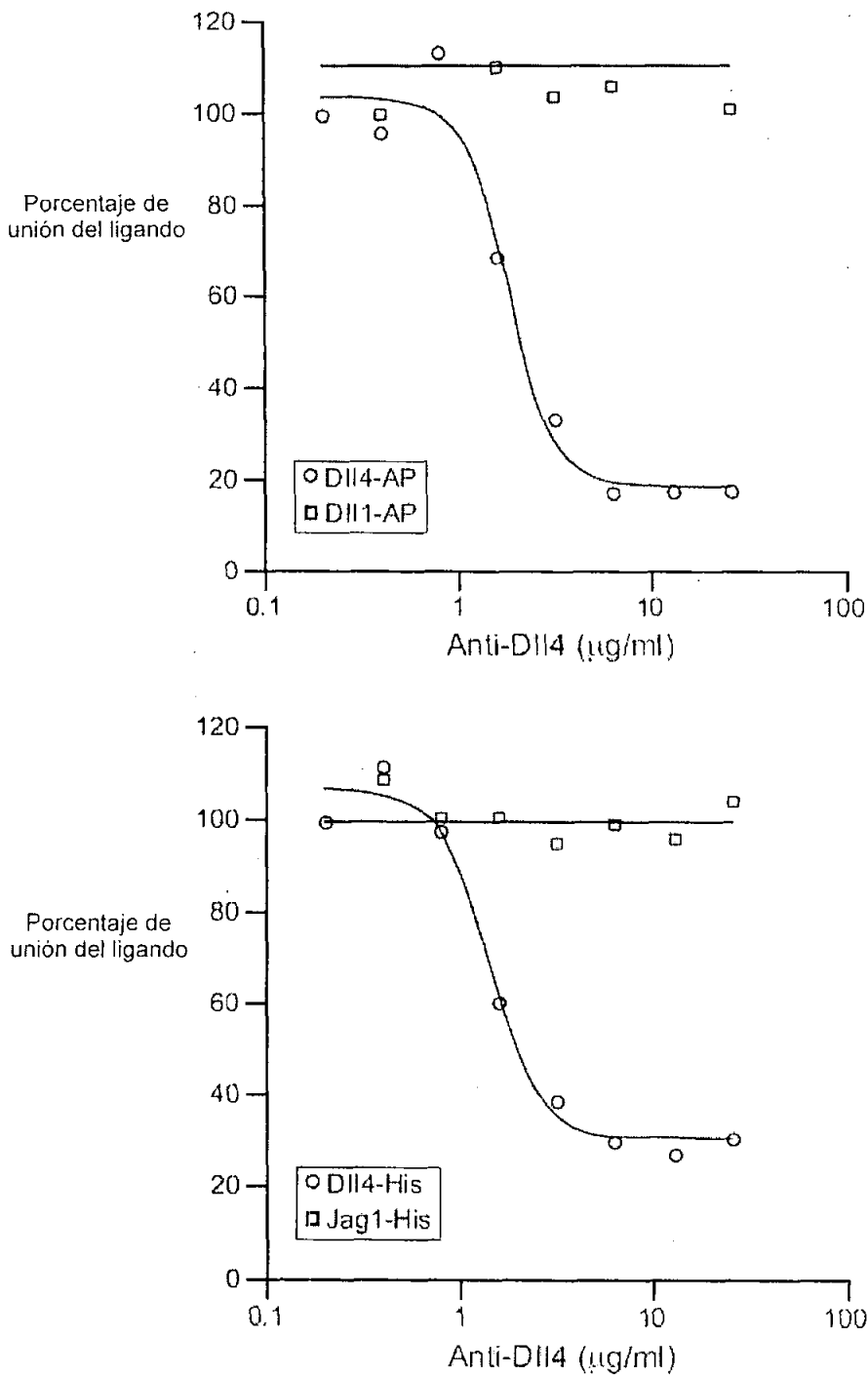


FIG. 11d

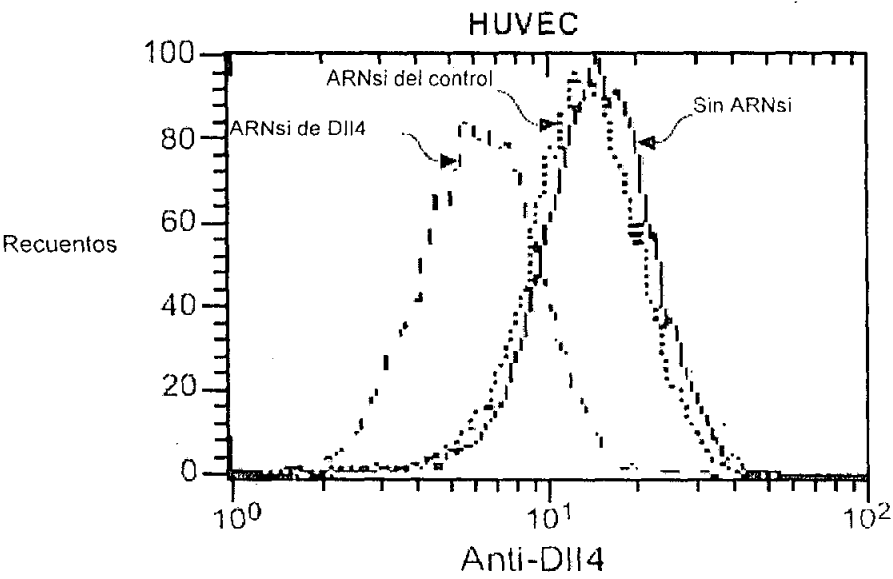


FIG. 11e

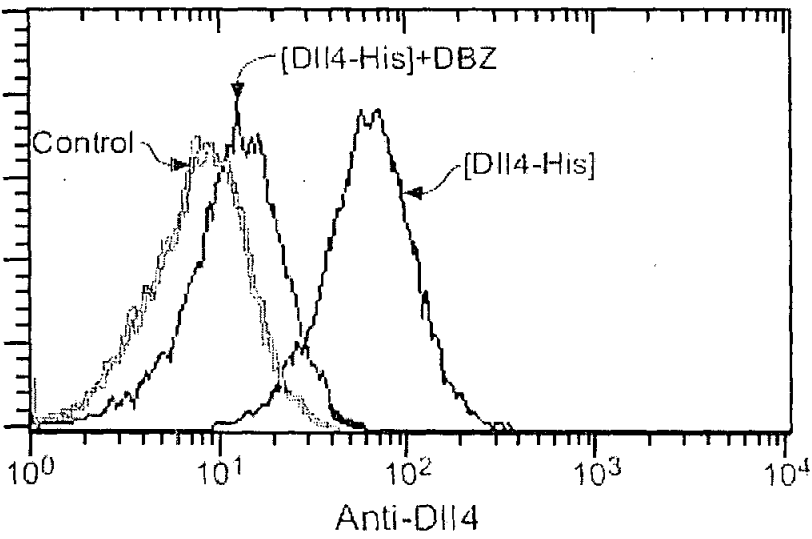


FIG. 12

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing
Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.
YAN, Minhong
Wu, Yan

<120> ANTICUERPOS ANTI-DLL4 Y MÉTODOS QUE USAN ESTOS

<130> P2336R1

<150> US 60/811.349
<151> 2006-06-06

<150> US 60/811.357
<151> 2006-06-06

<150> US 60/866.767
<151> 2006-11-21

<150> US 60/866.772
<151> 2006-11-21

<160> 78

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Trp Ile Ser
5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 2
Gly Phe Ser Phe Arg Asp Asn Trp Ile Ser
5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 3
Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 4
 Gly Leu Ile Asn Pro Gln Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

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

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 5
 Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Glu Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 6
 Gly Leu Ile Asn Pro Thr Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 7
 Gly Val Ile Asn Ser Ile Ser Gly Ala Thr Ala Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 8
 <211> 18

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 8

Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 9

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 11

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 12

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
5

<210> 13

<211> 9

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 13

Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Gln Ser Thr
5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 14

Gln Gln Ser Val Asn Gly Pro Ala Thr
5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 15

Gln Gln Ser Tyr Asn Gly Pro Ser Thr
5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 16

Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Pro Ser Thr
5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 17

Gln Gln Trp Phe Ser Thr Ala Pro Thr
5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr
5

<210> 19

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 19

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

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

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

Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 20

<211> 81

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 20

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21

<211> 80

310

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 21

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

<210> 22

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 22

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

<210> 23

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 23

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

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

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

<210> 24
<211> 81
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 25
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 26

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 26

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 27

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 27

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 28

<211> 81

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 28

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

<210> 29

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 29

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

<210> 30

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 30

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

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

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

<210> 31
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 32
<211> 81
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 33

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 33

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 34

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 34

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 35

<211> 81

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 35

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

<210> 36

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 36

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

<210> 37

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 37

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

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

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

<210> 38
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 39
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15
Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 40

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 40

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

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 41

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 41

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

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 42

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 43

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 44

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 46

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 46

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

320

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 47
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 48
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 49
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 50
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<210> 51
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 51
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 52
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 53
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 53
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys

<210> 54
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Glu Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe
95 100 105
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110

<210> 55
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Ser Tyr Asn Gly Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 56
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Arg
20 25 30
Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asp Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe
95 100 105
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110

<210> 57
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Val Asn Gly Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 58

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe
 95 100 105
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 110

<210> 59

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<220>

<223> secuencia sintetizada

<400> 59

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 60

<211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<220>

<221> CAAT_señal base_modificada

<222> 2

<223> base es g, a, t o c

<400> 60

cncaat 6

<210> 61

<211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada

<220>

<221> polyA_señal

<222> completo

<223> señal de poliadenilación

<400> 61

aataaa 6

<210> 62

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> siARN

<400> 62

caactgccct tatggctttt t 21

<210> 63

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> siARN

<400> 63

aaagccataa gggcagttgt t 21

<210> 64

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> siARN

<400> 64

caactgccct tcaatttcac t 21

<210> 65

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> siARN

<400> 65

tgaattgaa gggcagttgt t 21

<210> 66

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> siARN

<400> 66

tgaccaagat ctcaactact t 21

<210> 67

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> siARN

<400> 67

gtagttgaga tcttggtcat t 21

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> siARN

 <400> 68
 ggccaactat gcttgtgaat t 21

 <210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> siARN

 <400> 69
 ttcacaagca tagttggcct t 21

 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de oligonucleótido

 <400> 70
 aagtcttgca aatgcagcta 20

 <210> 71
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de oligonucleótido

 <400> 71
 catcatcatt atcatcatca ttgtc 25

 <210> 72
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda oligonucleotídica

 <400> 72
 aattcttgga aaagtgga gacaaaaat 29

 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de oligonucleótido

GENENLAW-#246265-v1-P2336R1_-_Spanish_Translation_of_Sequence_Listing

<400> 73
ctttccacca gcaggaagta g 21

<210> 74
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 74
tgcagtccga ggtccttt 18

<210> 75
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda oligonucleotídica

<400> 75
cgcatTTgat tttcatttcg acaacaga 28

<210> 76
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 76
gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 77
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 77
gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 78
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda oligonucleotídica

<400> 78
caagcttccc gttctcagcc 20

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

KALINOWSKI, Grant
Genentech, Inc.
1 DNA Way, MS-49
South San Francisco, California 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

25 March 2008 (25.03.2008)

Applicant's or agent's file reference

P2336R1 WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2007/070513

International filing date (day/month/year)

06 June 2007 (06.06.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

WU, Yan
846 Andromeda Lane
Foster City, California 94404
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

WU, Yan
1160 Blythe Street
Foster City, California 94404
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Qiu Anman

Facsimile No. +41 22 338 89 65

e-mail pt02.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 02

NAH/CLK 330

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

Genentech, Inc.
Attn. Kalinowski, Grant
1 DNA Way MS-49
South San Francisco CA 94080-4990
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED

SEP 04 2008

GENENTECH, INC.

LEGAL DEPT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing

(day/month/year)

27/08/2008

Applicant's or agent's file reference

P2336R1 WO ✓

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2007/070513 ✓

International filing date

(day/month/year)

06/06/2007 ✓

Applicant

GENENTECH, INC.

Calendared/CLK

Resp to ISR/Consid Ch 2 - 27 OCT 08

Ch 2 Deadline/Resp to WO - 27 NOV 08

30 DAY US IDS - 26 SEP 08 - P2336R1

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stefanie Büchler

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P2336R1 WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/070513	International filing date (day/month/year) 06/06/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 06/06/2006
Applicant GENENTECH, 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 8 sheets.



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

1. Basis of the report

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



the international application in the language in which it was filed



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

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

c. ☒

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

2.



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

3.



Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant



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

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 6



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

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/22 C12N15/13 C12N5/12 A61K39/395 A61P35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU ZHAO-JUN ET AL: "Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY MAY 2006, vol. 20, no. 7, May 2006 (2006-05), pages 1009-1011, XP002491745 ISSN: 1530-6860 the whole document	28
Y	----- -/--	1-27, 29-43

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 August 2008

Date of mailing of the international search report

27/08/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ferreira, Roger

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (D114) is critical for tumor growth and angiogenesis." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721 & 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006 ISSN: 0197-016X abstract	1-43
Y	PATEL NILAY S ET AL: "Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 8690-8697, XP002452160 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document	1-43
Y	WO 2005/012359 A (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; GERBER HANSPETER [US]; LIANG WE) 10 February 2005 (2005-02-10) cited in the application abstract claims 1-69	1-43
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-43
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	1-43
6	-/--	

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REHMAN AASIA O ET AL: "Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 16, no. 6, May 2006 (2006-05), pages 293-300, XP002457721 ISSN: 0962-8924 the whole document	
A	WILLIAMS CASSIN KIMMEL ET AL: "Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function" BLOOD, vol. 107, no. 3, February 2006 (2006-02), pages 931-939, XP002457722 ISSN: 0006-4971 the whole document	
A	MAILHOS CAROLINA ET AL: "Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 69, no. 2-3, December 2001 (2001-12), pages 135-144, XP002452161 ISSN: 0028-0836 the whole document	
A	LIU ZHAO-JUN ET AL: "REGULATION OF NOTCH1 AND DLL4 BY VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS: IMPLICATIONS FOR MODULATING ARTERIOGENESIS AND ANGIOGENESIS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 23, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 14-25, XP009083465 ISSN: 0270-7306 the whole document	
A	DORSCH MARION ET AL: "Ectopic expression of Delta4 impairs hematopoietic development and leads to lymphoproliferative disease" BLOOD 15 SEP 2002,, vol. 100, no. 6, 15 September 2002 (2002-09-15), pages 2046-2055, XP002484537 the whole document -/--	

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of D114 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1083-1087, XP002457725 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-43
P,X	NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of D114 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1032-1037, XP002457724 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-43
P,X	LOBOV I B ET AL: "Delta-like ligand 4 (DII4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 9, February 2007 (2007-02), pages 3219-3224, XP002457726 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-43
P,X	US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22) the whole document	1-43
P,X	WO 2007/028110 A (VASGENE THERAPEUTICS INC [US]; GILL PARKASH [US]; DUARTE ANTONIO [PT];) 8 March 2007 (2007-03-08) the whole document	1-43
E	WO 2007/070671 A (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21) the whole document	1-43
T	SAINSON R C A ET AL: "Anti-D114 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE 2007 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 9, 2007, pages 389-395, XP002457727 ISSN: 1471-4914	

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	THURSTON G ET AL: "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth" NATURE REVIEWS CANCER 2007 UNITED KINGDOM, vol. 7, no. 5, 2007, pages 327-331, XP002457728 ISSN: 1474-175X 1474-1768	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005012359 A	10-02-2005	AU 2004262006 A1	10-02-2005
		BR PI0412637 A	26-09-2006
		CA 2533297 A1	10-02-2005
		EP 1648939 A2	26-04-2006
		JP 2007526756 T	20-09-2007
		KR 20060067950 A	20-06-2006
		MX PA06001319 A	04-05-2006
		US 2005106667 A1	19-05-2005
US 2006134121 A1	22-06-2006	NONE	
WO 2007028110 A	08-03-2007	AU 2006287228 A1	08-03-2007
		CA 2621226 A1	08-03-2007
		EP 1928486 A2	11-06-2008
WO 2007070671 A	21-06-2007	AU 2006326417 A1	21-06-2007
		US 2008107648 A1	08-05-2008

PCT

340

To:

see form PCT/ISA/220

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

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

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

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/070513

International filing date (day/month/year)
06.06.2007

Priority date (day/month/year)
06.06.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/22 C12N15/13 C12N5/12 A61K39/395 A61P35/00

Applicant
GENENTECH, 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 43bis.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 usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Ferreira, Roger

Telephone No. +49 89 2399-2711



Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished 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 and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

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

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)	Yes: Claims	<u>1-27,29-43</u>
	No: Claims	<u>28</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-43</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-43</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

Reference is made to the following documents:

- D1: LIU ZHAO-JUN ET AL: "Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY MAY 2006, vol. 20, no. 7, May 2006 (2006-05), pages 1009-1011, XP002491745 ISSN: 1530-6860
- D2: NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is critical for tumor growth and angiogenesis." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721 & 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006 ISSN: 0197-016X
- D3: PATEL NILAY S ET AL: "Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 8690-8697, XP002452160 ISSN: 0008-5472 cited in the application
- D4: WO 2005/012359 A (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; GERBER HANSPETER [US]; LIANG WE) 10 February 2005 (2005-02-10) cited in the application
- D5: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799
- D6: DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933

Subject-matter of the application

The present application relates to an **isolated anti-DLL4 antibody** comprising at least one **hypervariable region (HVR)** sequence, wherein **HVR-L1** comprises a sequence as set forth in **SEQ ID NO:10**, **HVR-L2** in **SEQ ID NO:11**, **HVR-L3** in one of **SEQ ID NOS:12-18**, **HVR-H1** in one of **SEQ ID NOS:1 and 2**, **HVR-H2** in one of **SEQ ID NOS:3-8**, and **HVR-H3** in **SEQ ID NO:9**. A polynucleotide encoding said antibody, a vector comprising said polynucleotide, a host cell comprising said vector and a method for making said antibody by use of said host cell are also claimed. The present application also relates to the use of said antibody in **therapeutic applications**.

Re Item II

1. **Priority, Rules 43*bis*.1 and 64.1 PCT**

This preliminary opinion is being established under the assumption that the entire subject-matter is entitled to the claimed priority. If this is not the case, the "P/X" documents cited in the search report may have to be considered for novelty and inventive step, and the "E" document for novelty.

Re Item V

1. **Novelty, Article 33(2) PCT**

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 28 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

1.1 D1 discloses (see abstract, page E203 right-hand column fourth paragraph, paragraph bridging pages E203 and E204, figure 1 of the Full-Length Article) a method for detection of DLL4 in a biological sample by use of an anti-DLL4 antibody. D1 thus anticipates the subject-matter of claim 28.

1.2 Claims 1-27 and 29-43 appear to be novel in view of the documents cited in the International Search Report.

2. **Sufficiency of disclosure, Support and Inventive step, Article 5, 6 and 33(3) PCT**

2.1 As far as the claims employ antibodies only characterized by part of their sequence (e.g. only some of the CDRs or various combinations of CDRs, as well as various variants thereof) the claims do not fulfill the requirements of Articles 5, 6 and 33(3) PCT:

The present application only discloses antibodies comprising specific VL and VH regions (see, for example, figure 6).

It is well established in the art that the formation of an intact antigen-binding site as well as the maintenance of the antigen-binding specificity and affinity critically depends on the amino acid sequence and conformations of each CDRs of the light and heavy chains.

It is further expected that all CDRs in the proper order and in the context of the framework sequences which maintain their required conformation, are required to produce a polypeptide having functional antigen-binding sites. D5, for example, discloses (see, e.g. abstract) that a single CDR is not sufficient to give rise to a functional antibody molecule.

As can be seen from, e.g. D4, the presence of the identical CDR1, CDR2 and CDR3 sequences of the light chain of the antibodies of the present application in the context of different CDRs sequences of the heavy chain results in an antibody with a different specificity

(i.e. an antibody which specifically binds VEGF). Indeed, D4 discloses (see claim 50) an anti-VEGF antibody which comprises a VL having CDR1, CDR2 and CDR3 sequences which share 100% identity with SEQ ID NOs:10, 11 and 12, respectively. Accordingly, it is unlikely that all the antibodies encompassed by the present claims have the required function and thus solve the problem of the invention (Article 33(3) PCT). Moreover, it is not sufficient to characterize an antibody by one or two of the CDR sequences (or various combinations or variants thereof) since antigen-binding specificity depends on all three CDRs and four framework regions (which hold said CDRs in the correct conformation) of each of the heavy and light chains (i.e. 6 CDRs in total). The specification of one CDR in the absence of the other CDR sequences or various combinations of different CDR sequences or variants thereof is therefore unlikely to provide all essential features of the antibody (Article 5 PCT). D6, for example, teaches (see, e.g. abstract and discussion) that all three CDRs of camelised VH are responsible for affinity and antigen-binding. Moreover, D5 teaches (see, e.g. pages 485-486 under "Biological properties") that due to aggregation, low expression level and low stability, the generation of only VL or VH is not possible as long as they are not camelised. Since there is no teaching in the present application of how to obtain such VL or VH sequences from the disclosed antibodies, the claims concerned lack support (Article 6 PCT).

As a consequence, claims 1-5, 11-16 and 31-33 are not considered to meet the requirements of Articles 5, 6 and 33(3) PCT.

- 2.2 The same reasoning as given above under Re Item V.2.1 applies *mutatis mutandis* to claims 17-27, relating to nucleic acids encoding said antibodies, vectors and host cells and their use for the production of said antibodies, which is common practice.

The subject-matter of claims 17-27 is, therefore, not considered to involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

- 2.3 The subject-matter of claims 6-10 is not considered to involve an inventive step for the following reasons:

D2, which may be regarded as the closest prior art with regard to the subject-matter of the present application, discloses (see abstract) the use of a DLL4 antagonist (i.e. a soluble DLL4-Fc molecule) for blocking DLL4 function in tumors. D2 further teaches that DLL4 is a protein encoded by a VEGF-regulated gene, and therefore may be an attractive potential target for the development of anti-angiogenic therapies. In addition, D3 discloses (see

abstract, page 8693 left-hand column second full paragraph to page 8695 left-hand column second paragraph, discussion, figures 2-6) that down-regulation of DLL4 (a VEGF-regulated protein) expression using RNA interference leads to the inhibition of endothelial cell proliferation, migration and network formation, all of which are important processes in tumor angiogenesis. D3 further teaches that an optimal window of the DLL4 expression is essential for tumor angiogenesis and that selective modulation of DLL4 within tumors may represent a potential anti-angiogenic therapy.

The subject-matter of the present application differs from the disclosure of D2 in that the antagonists used for blocking DLL4 function in tumors are anti-DLL4 neutralizing antibodies.

In absence of apparent surprising technical effect relating to the use of said antibodies, the problem to be solved by the present application might be considered as the provision of additional DLL4 antagonists in order to treat tumors.

D4 discloses (see abstract, claims 1-69) the use of anti-VEGF neutralizing antibodies as anti-angiogenic agents for treating tumors.

For the skilled person, therefore, starting from the disclosure of D2 and D3, which relate to the fact that DLL4 expression is regulated by VEGF (a protein well-known in the art as being implicated in tumor angiogenesis) and that specific inhibition of DLL4 function is very likely to represent an anti-angiogenic therapy, and aware of the disclosure of D4, which refers to anti-VEGF neutralizing antibodies and their use in treating tumor angiogenesis, it would be obvious to use the same methods for producing antibodies as the ones disclosed in D4 (*i.e.* through generation of synthetic phage antibody libraries built on humanized anti-ErbB2 antibody, 4D5, framework, as used in the present application) in order to design and generate anti-DLL4 neutralizing antibodies to provide additional DLL4 antagonists for treating tumors. The **selection** of a particular anti-DLL4 neutralizing antibody without assigned function (*i.e.* an anti-DLL4 antibody comprising HVR-L1 of SEQ ID NO:10, HVR-L2 of SEQ ID NO:11, HVR-L3 of one of SEQ ID NOs:14-18, HVR-H1 of one of SEQ ID NOs:1 and 2, HVR-H2 of one of SEQ ID NOs:3 and 5-8, and HVR-H3 of SEQ ID NO:9, according to claims 6-10) from a group of anti-DLL4 neutralizing antibodies is considered **arbitrary**.

Therefore, the subject-matter of claims 6-10 is not considered to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

- 2.4 The same reasoning as given above under Re Item V.2.3 applies *mutatis mutandis* to the subject-matter of claims 29-30 and 34-43. Indeed, D4 also discloses (see abstract, claims 1-69) methods for diagnosing and/or treating a tumor by use of said anti-VEGF neutralizing antibodies.

Claims 29-30 and 34-43 are thus not considered to fulfil the requirements of Article 33(3) PCT for lack of inventive step of their subject-matter.

3. Remark concerning claims 28-30 and 34-43

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

4. General remark

The claims have been considered to relate to anti-DLL4-antibodies comprising at least one HVR, wherein said HVR comprises a sequence as set forth in one of SEQ ID NOs:1-18, to methods of producing said antibodies, and to methods for diagnosing and/or treating tumors by use of said antibodies. In addition, the examples of the present application disclose said methods only in the context of said specific anti-DLL4 antibodies. However, present claims 28-30 relate to methods for detecting DLL4 and for diagnosing a disorder associated with DLL4 expression by use of anti-DLL4 antibodies which are not limited to the ones disclosed and exemplified in the present application (indeed these claims relate to any anti-DLL4 antibody). Due to the disclosure of D1 (which discloses a method for detection of DLL4 in a biological sample by use of an anti-DLL4 antibody (see abstract, page E203 right-hand column fourth paragraph, paragraph bridging pages E203 and E204, figure 1 of the Full-Length Article)), the subject-matter of claims 28, 29 and 30 might not be considered to be linked by a **single general inventive concept** to the subject-matter of claims 1-27 and 31-43.

Re Item VI

1. Certain published documents

- D7: RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1083-1087, XP002457725 ISSN: 0028-0836
- D8: NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006

(2006-12), pages 1032-1037, XP002457724 ISSN: 0028-0836

D9: LOBOV I B ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 9, February 2007 (2007-02), pages 3219-3224, XP002457726 ISSN: 0027-8424

D10: US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22)

D11: WO 2007/028110 A (VASGENE THERAPEUTICS INC [US]; GILL PARKASH [US]; DUARTE ANTONIO [PT];) 8 March 2007 (2007-03-08)

D12: WO 2007/070671 A (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21) (E)

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

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

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ PCT/US2007/070513 ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO ANTICUERPOS ANTI-DLL4 Y METODOS QUE LOS USAN

CLASIFICACION _____

EXPEDIENTE No. _____ FECHA DE SOLICITUD _____ ROLLO MICROFILM _____

CERTIFICADO No. _____ FECHA DE CONCESION _____ VIGENCIA DESDE _____ HASTA _____

PRORROGA _____ CAMBIO DE NOMBRE _____

TRASPASO A _____

INVENTOR (ES) MINHONG YAN, YAN WU.

OTROS _____

OFICINA DE COMUNICACIONES

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

KALINOWSKI, Grant
Genentech, Inc.
1 DNA Way, MS-49
South San Francisco, California 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 March 2008 (18.03.2008)	
Applicant's or agent's file reference P2336R1 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/070513	International filing date (day/month/year) 06 June 2007 (06.06.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 06 June 2006 (06.06.2006)
Applicant GENENTECH, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
06 June 2006 (06.06.2006)	60/811,349	US	08 March 2008 (08.03.2008)
06 June 2006 (06.06.2006)	60/811,357	US	08 March 2008 (08.03.2008)
21 November 2006 (21.11.2006)	60/866,772	US	08 March 2008 (08.03.2008)
21 November 2006 (21.11.2006)	60/866,767	US	08 March 2008 (08.03.2008)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Ellen Moyse

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail PT02.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 02

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.018.193 MT/FOP 20070401/0.20.5.9
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2336R1 WO
I	Title of Invention	ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC.
II-5	Address	1 DNA Way South San Francisco, California 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	650.225.1000
II-9	Facsimile No.	650.952.9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	YAN, Minhong
III-1-5	Address	411 Nantucket Street Foster City, California 94404 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

AK

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	WU, Yan
III-2-5	Address	846 Andromeda Lane Foster City, California 94404 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	KALINOWSKI, Grant
IV-1-2	Address	Genentech, Inc. 1 DNA Way, MS-49 South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	650.467.2607
IV-1-4	Facsimile No.	650.952.9881
IV-1-5	e-mail	grantk@gene.com
IV-1-6	Agent's registration No.	48,314
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	AGARWAL, Atulya R. (40,887); ANDRUS, Alex (44,509); BARNES, Elizabeth M. (35,059); COBURN, Cara M. (46,631); BARRY, Anna L. (51,436); CONLEY, Deirdre (36,487); CUI, Steven X. (44,637); ELLIOTT, Jennifer (50,584); EVANS, David (41,430); HASAK, Janet E. (28,616); JOHNSTON, Sean A. (35,910); KRESNAK, Mark T. (42,767); KUBINEC, Jeffrey S. (36,575); LEE, Wendy M. (40,378); MARSCHANG, Diane L. (35,600); NAIK, Paul (49,075); PASQUALONE, Danielle (43,847); PLEASURE, Irene (45,506); SCHWARTZ, Timothy R. (32,171); SHERMAN, Daniel (53,586); SHIN, Elinor K. (43,117); SVOBODA, Craig G. (39,044); TAN, Lee K. (39,447); YEUNG, Bonnie (53,811); WANG, Min (51,303)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	06 June 2006 (06.06.2006)
VI-1-2	Number	60/811,349
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	06 June 2006 (06.06.2006)
VI-2-2	Number	60/811,357
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority claim of earlier national application	
VI-3-1	Filing date	21 November 2006 (21.11.2006)
VI-3-2	Number	60/866,772
VI-3-3	Country	US
VI-4	Priority claim of earlier national application	
VI-4-1	Filing date	21 November 2006 (21.11.2006)
VI-4-2	Number	60/866,767
VI-4-3	Country	US
VI-5	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2, VI-3, VI-4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-6	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.		
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	119	-
IX-3	Claims	5	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	24	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	154	
IX-6a	Sequence listing part of description	0	-
IX-7	TOTAL	154	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. none	-
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form		
IX-16(A) - (I)	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	-	1 txt file
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	9e	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Grant KALINOWSKI, Reg. No. 48,314/	
X-1-1	Name (LAST, First)	KALINOWSKI, Grant	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JULY 05, 2006

PTAS

500122643A

500122643A

CARA M. COBURN
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 07/05/2006

REEL/FRAME: 017880/0053

NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2372

ASSIGNOR:
YAN, MINHONG

DOC DATE: 06/30/2006

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94090

SERIAL NUMBER: 60811357

FILING DATE: 06/06/2006

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

07/05/2006
500122643

SUBMISSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

NATURE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Minhong Yan	06/30/2006

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS-49
City:	South San Francisco
State Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94090

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60811357

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 6504676222
Email: pgolden@gene.com
Correspondent Name: Cara M. Coburn
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS-49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

PR2372

NAME OF SUBMITTER:

Cara M. Coburn

Total Attachments: 1

source=assignment#page1.tif

CH-\$40.00 60811357

ASSIGNMENT

WHEREAS, Minhong Yan, a citizen of the USA residing at 411 Nantucket Street, Foster City, CA 94404 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

for which a provisional application Serial No. 60/811,357, (Docket No. PR2372) has been filed on June 6, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR has and does hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC..

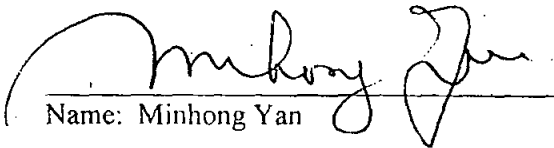
The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, his/her respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he/she has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

South San Francisco:

Date 6-30-2006


Name: Minhong Yan



360

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

DECEMBER 18, 2006

PTAS

500195631A

500195631A

GRANT KALINOWSKI
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 12/18/2006

REEL/FRAME: 018648/0772

NUMBER OF PAGES: 6

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2336-1

ASSIGNOR:

YAN, MINHONG

DOC DATE: 12/04/2006

ASSIGNOR:

WU, YAN

DOC DATE: 12/04/2006

ASSIGNEE:

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY

MS-49

SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080

018648/0772 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60866772

FILING DATE:

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Worksheet Version v1.1

12/18/2006
500195631

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
------------------	----------------

NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
-----------------------	------------

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Minhong Yan	12/04/2006
Yan Wu	12/04/2006

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS-49
C	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60866772

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650 467 2607
E: pgolden@gene.com
Correspondent Name: Grant Kalinowski
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS-49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR2336-1
-------------------------	----------

NAME OF SUBMITTER:	Grant Kalinowski
--------------------	------------------

Total Attachments: 4
source=PR2336#page1.tif

CH \$40.00 60866772

ORDINATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Patent and Trademark Office

Atty Dkt No: PR2336-1

Commissioner for Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Minhong Yan, Foster City, CA
Yan Wu, Foster City, CA

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment Merger

Security Agreement

Change of Name

Other:

Execution Date: 04-DEC-2006

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s) 60/866,772

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Grant Kalinowski
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

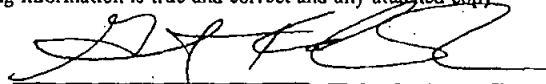
DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Grant Kalinowski

Name of Person Signing
Registration No. 48,314



Signature

Date

12/18/06

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 4

Revised (10/11/95)

ASSIGNMENT

WHEREAS, Minhong Yan, a citizen of the USA, residing at 411 Nantucket Street, Foster City, CA 94404, and Yan Wu, a citizen of the USA, residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

for which a provisional application Serial No. 60/866,772 (Docket No. PR2336-1) has been filed by them on 21-NOV-2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4490, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

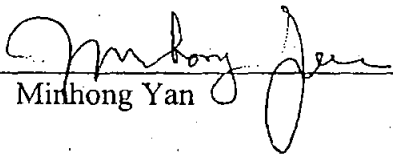
Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco
12/14/2006
Date


Name: Minhong Yan

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Date

Name: Minhong Yan

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

12/4/2006

Yan Wu



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JULY 07, 2006

PTAS

500123470A

CARA M. COBURN

1 DNA WAY

MS-49

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

500123470A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 07/07/2006

REEL/FRAME: 017895/0783

NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR2336

ASSIGNOR:

YAN, MINHONG

DOC DATE: 07/05/2006

ASSIGNOR:

WU, YAN

DOC DATE: 07/05/2006

ASSIGNEE:

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY

MS-49

SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080

017895/0783 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60811349

FILING DATE: 06/06/2006

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

07/07/2006
500123470

SUBMISSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

NATURE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Minhong Yan	07/05/2006
Yan Wu	07/05/2006

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS-49
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60811349

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881

Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.

Phone: 650 467 6222

Email: pgolden@gene.com

Correspondent Name: Cara M. Coburn

Address Line 1: 1 DNA Way

Address Line 2: MS-49

Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

PR2336

NAME OF SUBMITTER:

Cara M. Coburn

Total Attachments: 3

source=assignment- 07-07-06 - LYS2LEJ#page1.tif

CH \$40:00 60811349

source=assignment-07-07-06 - LYS2LEJ#page2.tif
source=assignment-07-07-06 - LYS2LEJ#page3.tif

ASSIGNMENT

WHEREAS, Minhong Yan, a citizen of the USA, residing at 411 Nantucket Street, Foster City, CA 94404, and Yan Wu, a citizen of the USA, residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTI-DLL4 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

for which a provisional application Serial No. 60/811,349 (Docket No. PR2336) has been filed by them on June 6, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4490, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

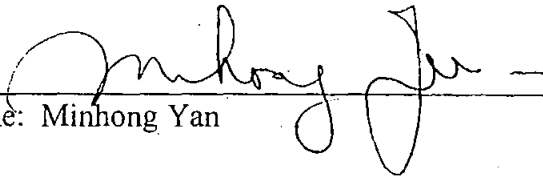
IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Date

7/5/2008

Name: Minhong Yan



South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Date

Name: Minhong Yan

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

7-5-2006

Yan Wu



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

DECEMBER 18, 2006

PTAS

500195621A

500195621A

GRANT KALINOWSKI
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 12/18/2006

REEL/FRAME: 018648/0732

NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

YAN, MINHONG

DOC DATE: 12/04/2006

ASSIGNEE:

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY

MS-49

SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080

SERIAL NUMBER: 60866767

FILING DATE:

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

018648/0732 PAGE 2

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Worksheet Version v1.1

12/18/2006
500195621

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
------------------	----------------

NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
-----------------------	------------

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Minhong Yan	12/04/2006

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS-49
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60866767

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650 487 2607
Email: pgolden@gene.com
Correspondent Name: Grant Kalinowski
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS-49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

NAME OF SUBMITTER:	Grant Kalinowski
--------------------	------------------

Total Attachments: 2
source=PR2372#page1.tif
source=PR2372#page2.tif

CH \$40.00 60866767

ORDINATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Patent and Trademark Office

Atty Dkt No: PR-2372-1

Commissioner for Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Minhong Yan, Foster City, CA

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment

Merger

Security Agreement

Change of Name

Other:

Execution Date: 04-DEC-2006

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s) 60/866,767

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Grant Kalinowski
GENENTECH, INC.

1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

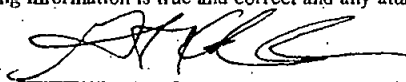
9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Grant Kalinowski

Name of Person Signing

Registration No. 48,314



Signature

12/18/06

Date

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 2

Revised (10/11/95)

ASSIGNMENT

WHEREAS, Minhong Yan, a citizen of the USA residing at 411 Nantucket Street, Foster City, CA 94404 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

for which a provisional application Serial No. 60/866,767, (Docket No. PR2372-1) has been filed on 21-NOV-2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR has and does hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, his/her respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he/she has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

South San Francisco:

Date

Name: Minhong Yan

AP: 777008
380

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

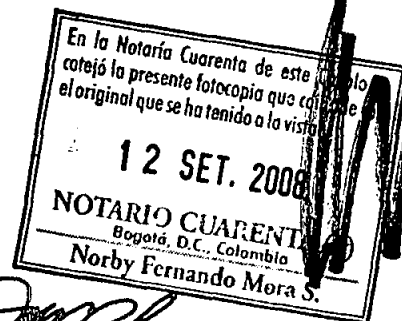
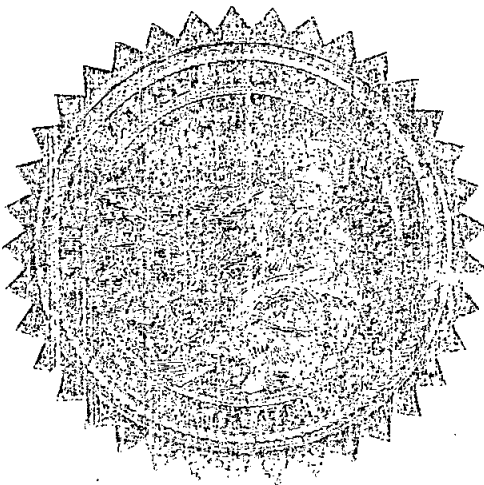
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

BY *[Signature]*

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

} ss.

On December 6, 2005 before me,

Date

Aida Miclat Guiam

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared

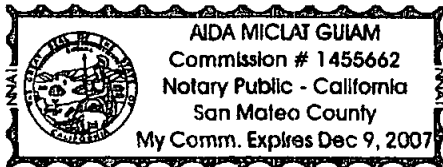
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ 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 signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Miclat Guiam

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Number of Pages: _____

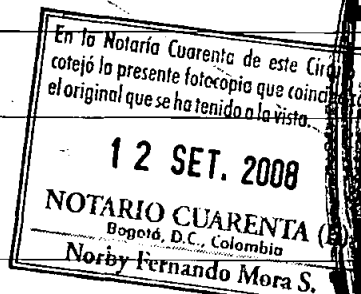
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

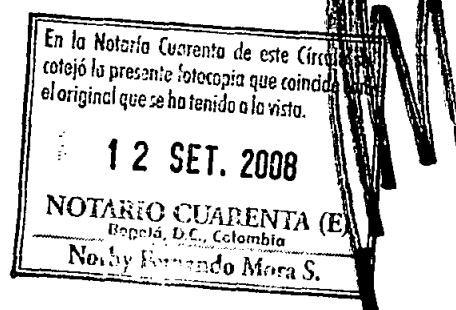
CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

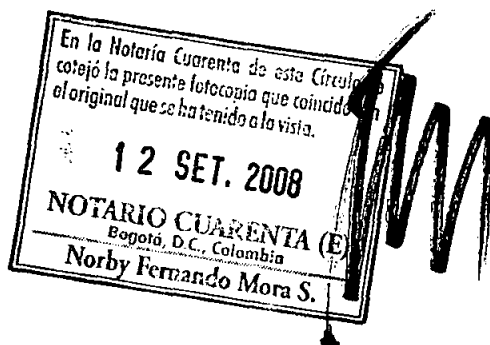
27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

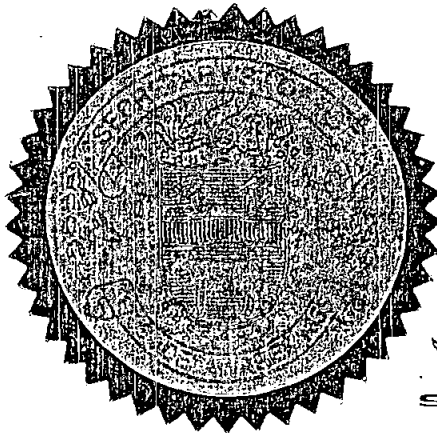
5. *at Dover, Delaware*

6. *the twenty-fourth day of May, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0254030*

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

En la Notaría Cuarenta de este Circuito
cotejó la presente fotocopia que coincide
el original que se ha tenido a la vista.

12 SET. 2008

NOTARIO CUARENTA (E)

Bogotá, D.C., Colombia

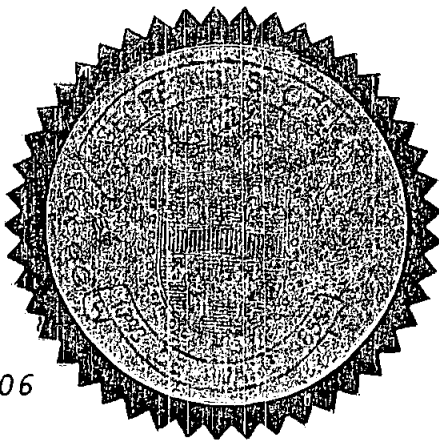
Noelby Fernando Mora S.

Delaware

PAGE 1

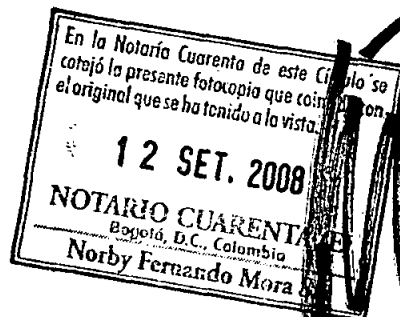
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

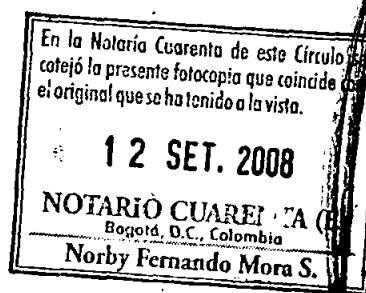
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

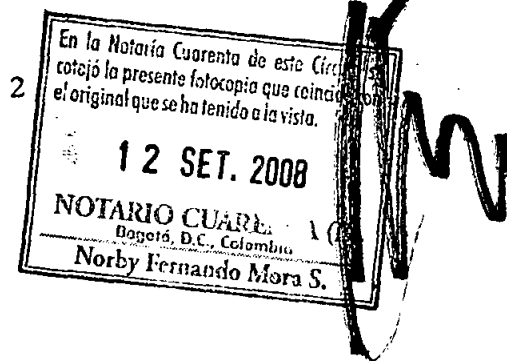
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

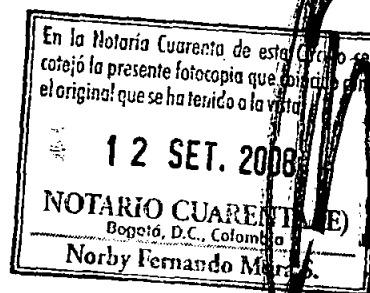
(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

3



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

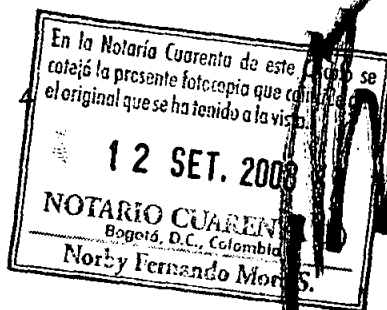
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

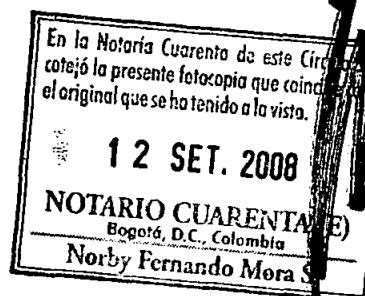
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

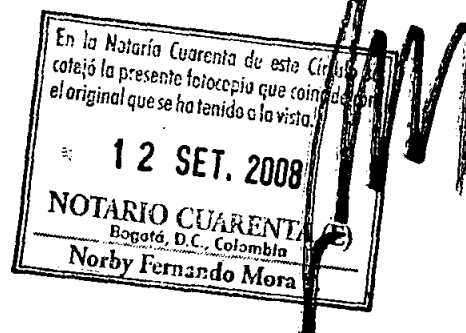
ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

6



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

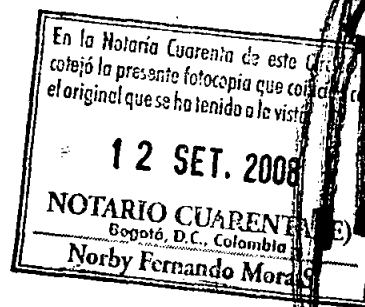
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

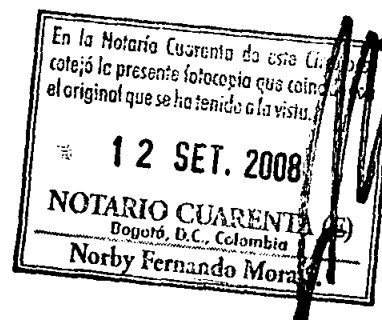
SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

8



meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

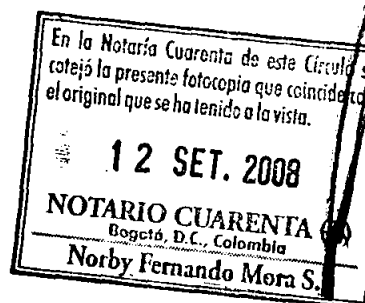
SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

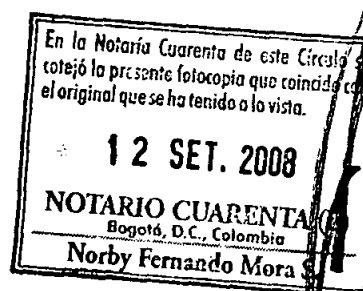
SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

9



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



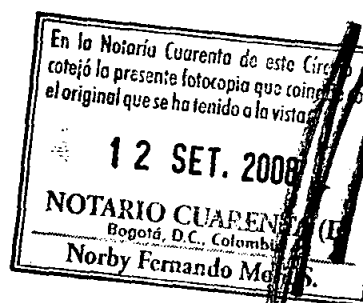
IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



400

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

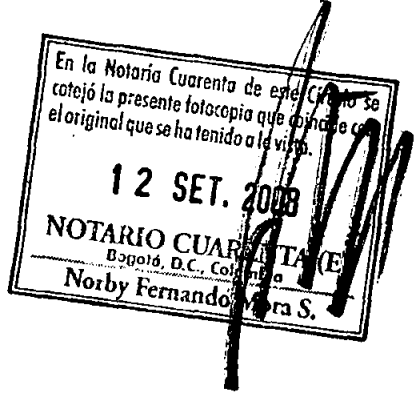
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
- 2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
- 3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
- 4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

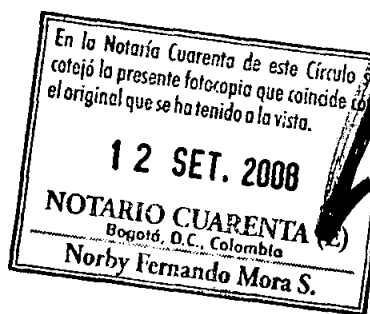
- 5. en Dover, Delaware
- 6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
- 7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
- 8. No. 0254030
- 9. Sello/timbre
- 10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

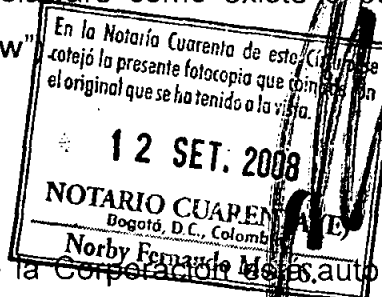
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de la Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede ser modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

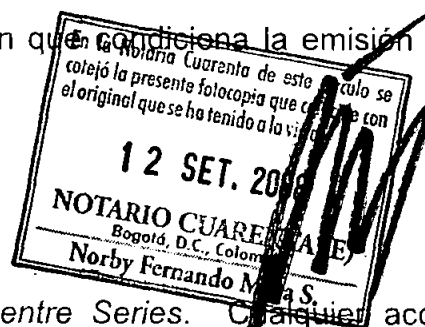
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro de las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que ~~en la cual se condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).~~

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

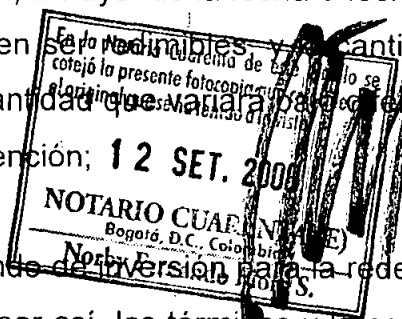
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará de acuerdo a las condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

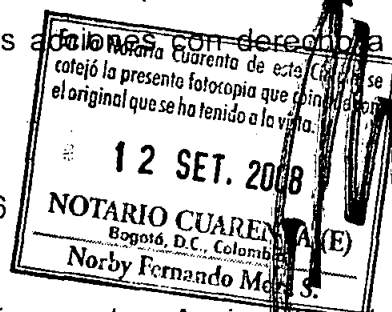
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

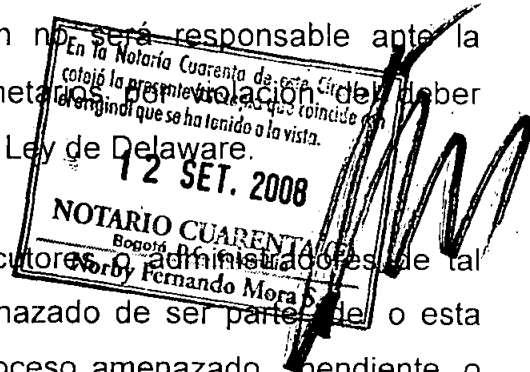


acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

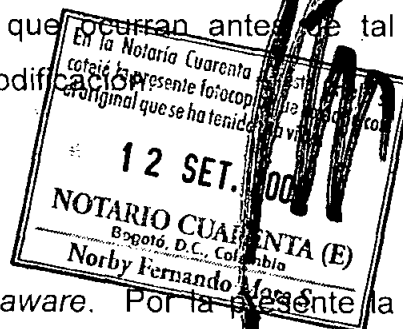
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

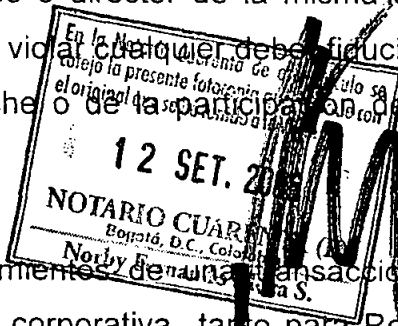
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma, será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiriera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

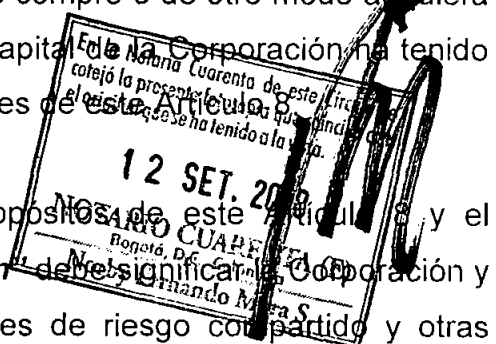


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se



define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante.* Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9.* Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Cerificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

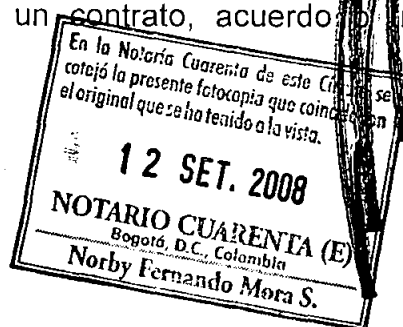
En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
12 SET. 2008
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Norby Fernando Mora S.

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

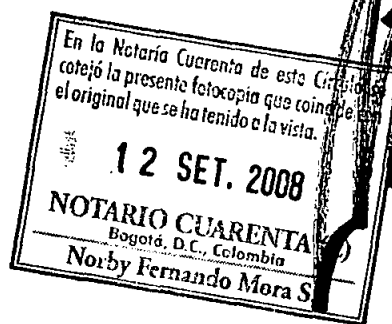
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

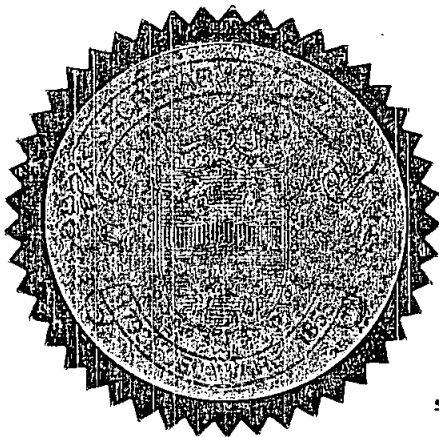
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

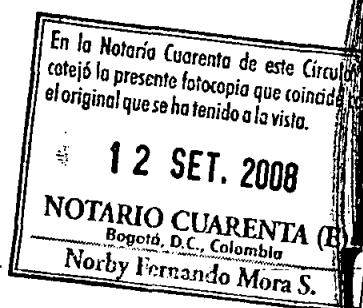
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

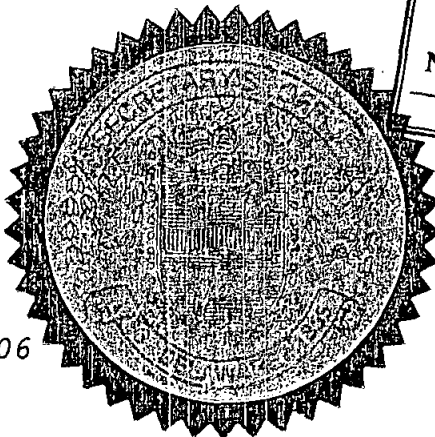


Delaware

PAGE 1

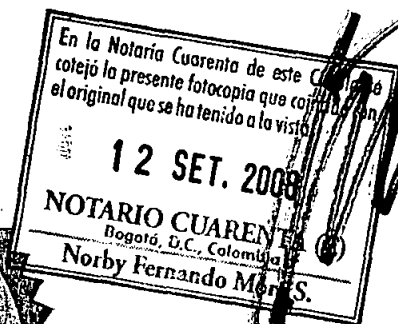
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

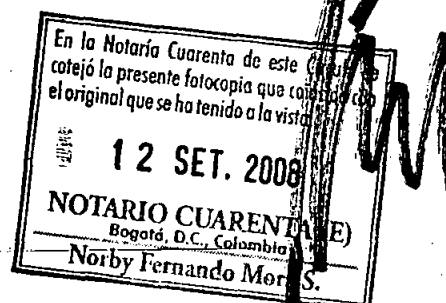
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

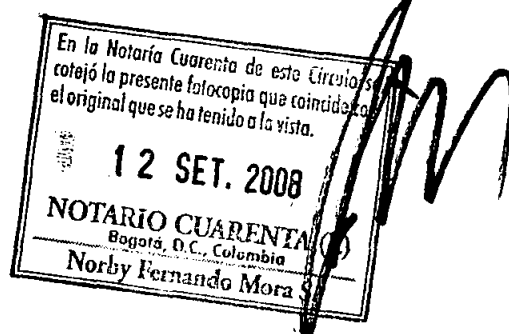
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

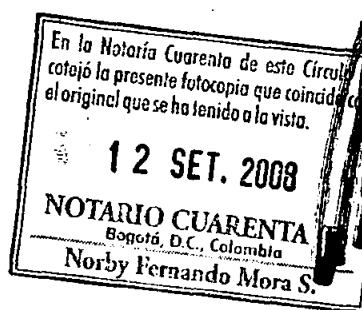
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

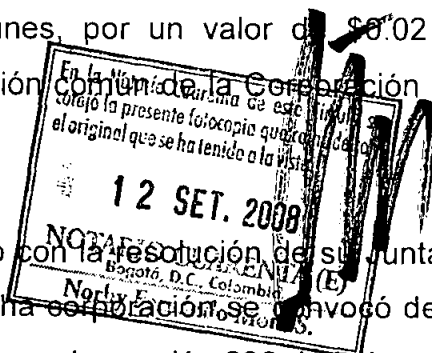
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

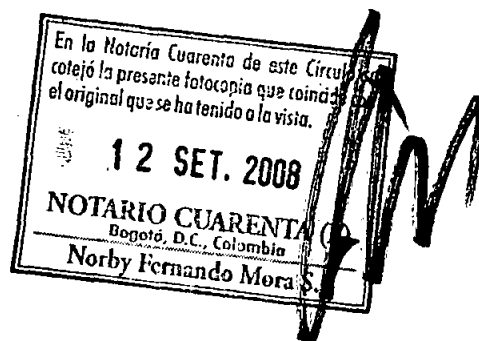
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



420

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

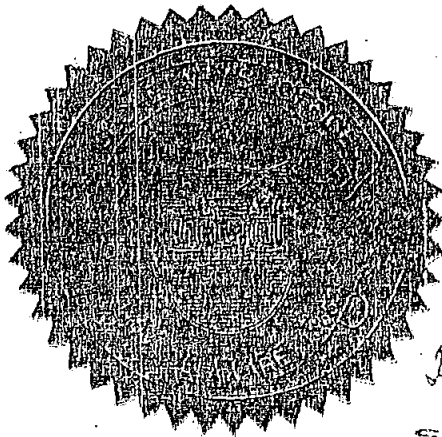
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D.: 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

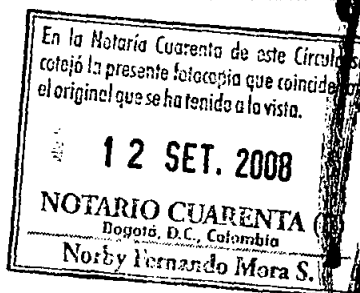
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



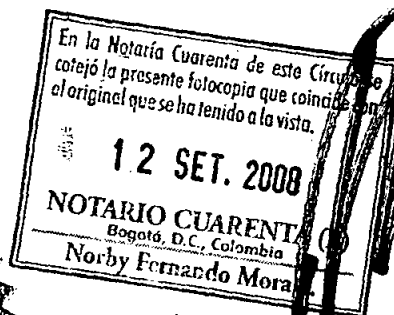
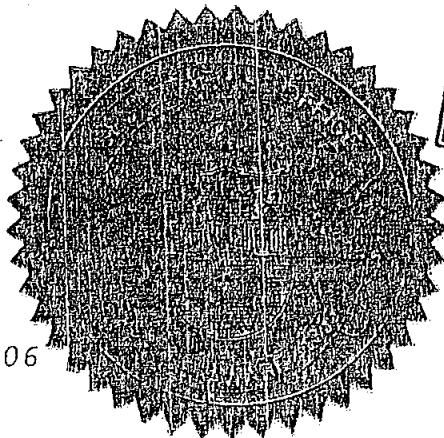
Delaware

PAGE 1

421

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

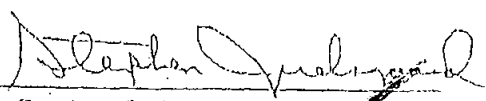
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

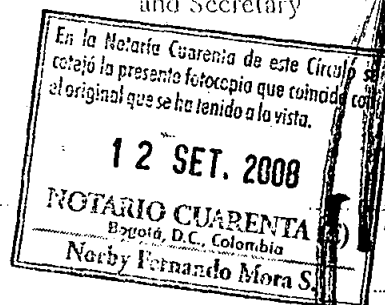
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



423

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

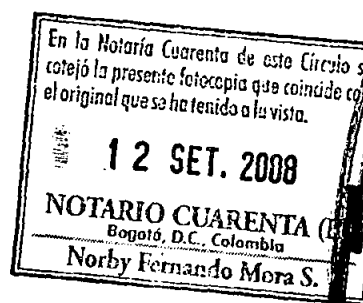
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado.

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

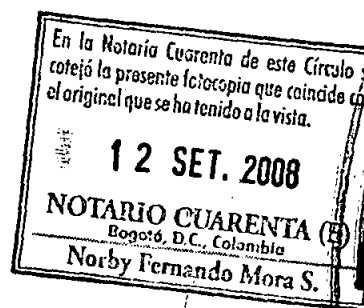
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



424

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

425

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

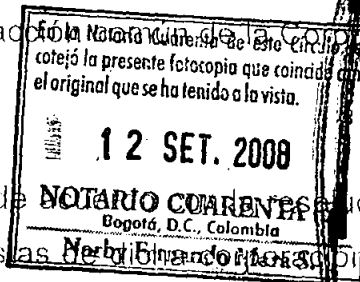
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de la Corporación se convocó debidamente



426

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

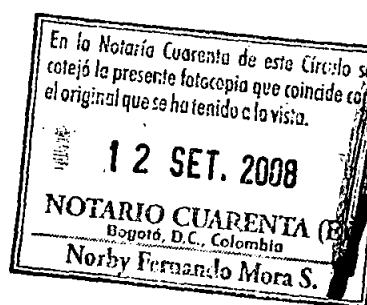
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



429

Apostille

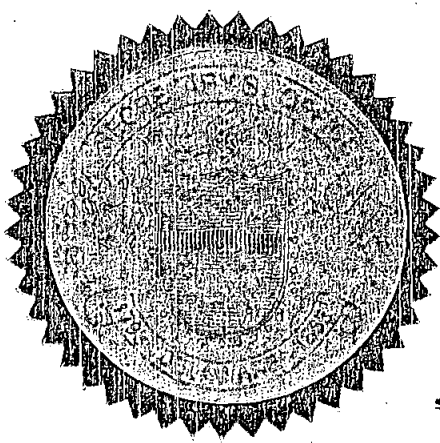
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

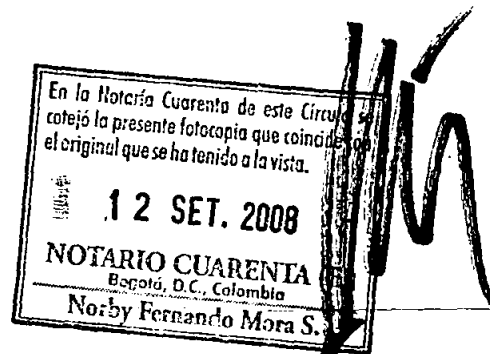
5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



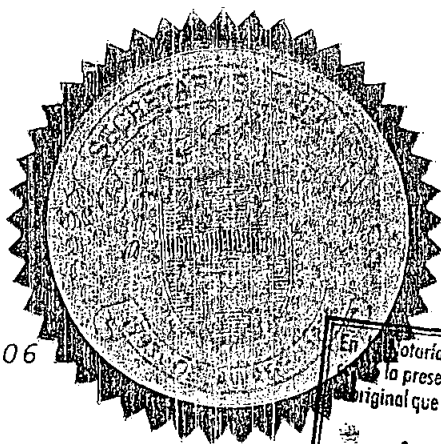
Delaware

PAGE 1

428

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900386

En Notaria Cuarenta de este Circulo
la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

DATE: 05-24-05

12 SET. 2008

NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia

Norby Ferrando Mora S.

429

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

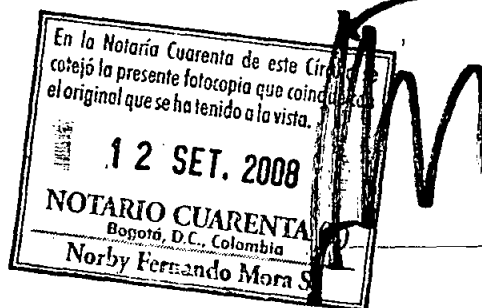
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

86747



430

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

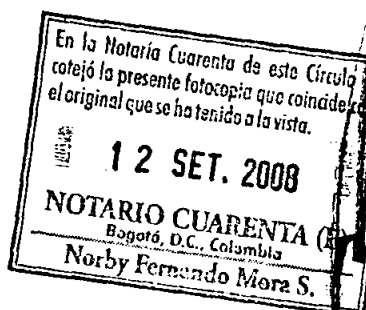
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

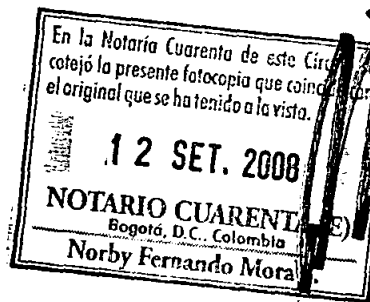
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



431

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

432

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
12 SET. 2008
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Jorge Mario Mora S.

433

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

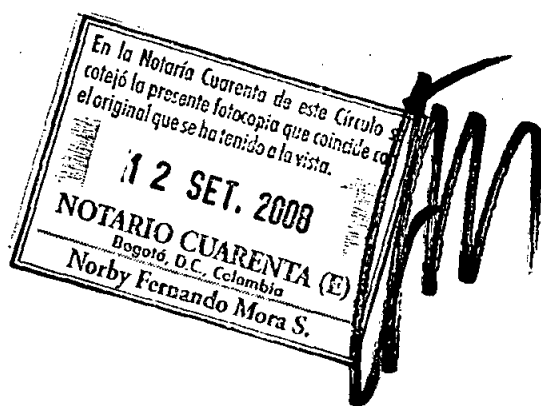
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.





No. 08-129885- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:51:42 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 433

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 ☒

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐

Felipe Navarro

Firma Responsable

Fecha

05-12-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Contactador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.cowww.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

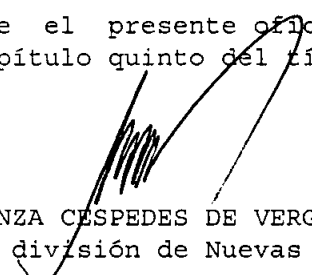
REFERENCIA	Radicación No.	8 129885
	Solicitud internacional	PCT/US2007/070513
	Fecha inicio fase nacional	06/01/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0611

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 23 ENE. 2009
jfernand