



Organización y  
Digitalización



CSA221037

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
INVENTARIO

ENTRADA EN FASE NACIONAL

08-129889

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA MODULACIÓN DEL DESARROLLO  
VASCULAR

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SNTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

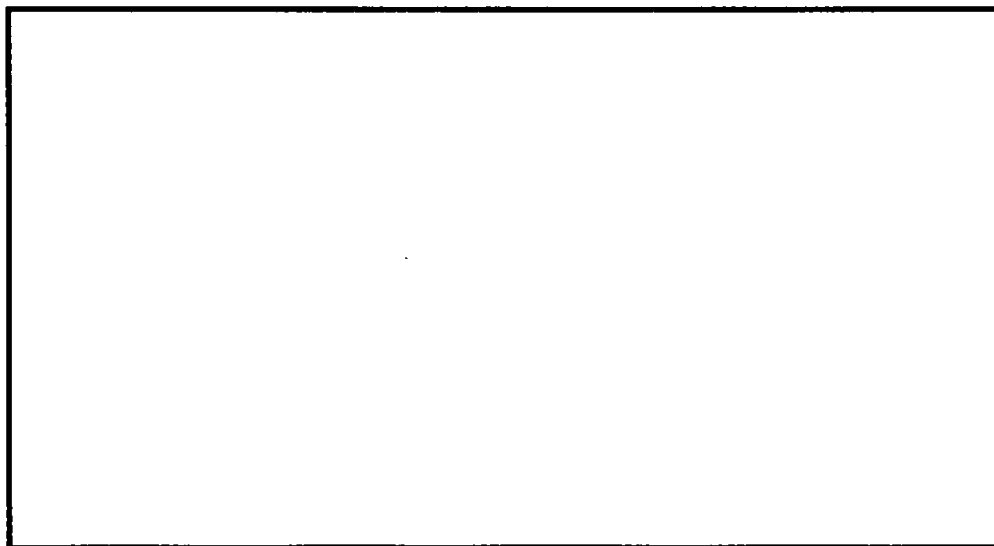
| PETITORIO                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AS: 108.836                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                    | SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO                                                                                             |                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                    | <br>No. 08-129889- -00000-0000                     |                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                    | Fecha: 2008-12-05 16:53:19 Dep. 2020 NUECREACIONE<br>Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI<br>Act. 411 PRESENTACION Folios: 348 |                                                                                                                                                                                                        |
| FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE<br>PCT<br>ENTRADA EN FASE NACIONAL                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 06 ene 2009                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 1 SOLICITUD DE:                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención. <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad.                               |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I. <input type="checkbox"/> Capítulo II.                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 2<br>SOLICITANTE<br>(71)                                                                                                                        | Nombre: GENENTECH, INC.<br><br>Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco,<br>California 94080, Estados Unidos de América<br>Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de<br>América<br>Lugar de Constitución: Estados Unidos de América<br>Teléfono: Fax:<br>E-mail |                                                                                                                                      | IDENTIFICACIÓN<br><br>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br>Cual _____<br>Número _____                          |
| 3<br>REPRESENTANTE<br>O APODERADO                                                                                                               | Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO<br><br>Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4,<br>Bogotá, Colombia.<br><br>Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200<br>E-mail:                                                                                                   |                                                                                                                                      | IDENTIFICACIÓN<br><br>C.C. <input checked="" type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br>Cual _____<br>Número 80.410.337 TP 57492 |
| 4<br>INVENTOR (ES)<br>(72)                                                                                                                      | Nombre: Minhong YAN.<br><br>Dirección: 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404, US.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.                                                                                                        |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 5 PCT (86)<br>Solicitud Internacional No. PCT/US2007/070516 Fecha 06-06-2007<br>Publicación Internacional No WO 2007/143689 A3 Fecha 13-12-2007 |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 6 Título (54): COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA MODULACIÓN DEL DESARROLLO VASCULAR                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 7 Clasificación Internacional (51):                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 8 Prioridad<br><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                           | (33) País de Origen                                                                                                                                                                                                                                                | (32) Fecha                                                                                                                           | (31) Número de Solicitud                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                 | US                                                                                                                                                                                                                                                                 | 06-06-2006                                                                                                                           | 60/811,357                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                 | US                                                                                                                                                                                                                                                                 | 21-11-2006                                                                                                                           | 60/866,767                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| 9 Comprobante de pago No. 08 – 85,494 Fecha 05-12-2008                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |
| Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                        |

10

## ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 501.000
- ☒ Documento que acredite 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

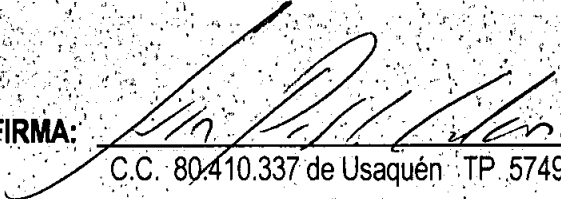
## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

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

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

108 836

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 85,494  
FECHA : OCTUBRE 29 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129889- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 16:53:19 Dep. 2020 NUECREACIONI  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 348

## \*\*\*\*\* 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.



CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
13 December 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2007/143689 A3

(51) International Patent Classification:  
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2007/070516

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

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

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

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): YAN, Minhong [US/US]; 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404 (US).

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

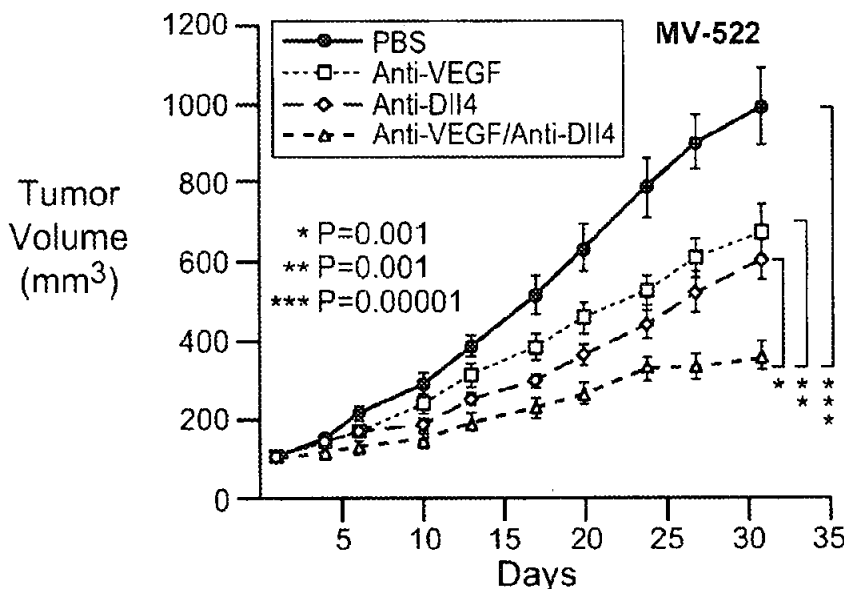
— with international search report  
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:  
14 February 2008

(48) Date of publication of this corrected version:  
8 May 2008

(15) Information about Correction:  
see Notice of 8 May 2008

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT



(57) Abstract: The present invention provides methods of using a DLL4 modulator to modulate vascular development. Furthermore, methods of treatment using DLL4 modulators, such as DLL4 antagonists, are provided.

WO 2007/143689 A3

8

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
13 December 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2007/143689 A3

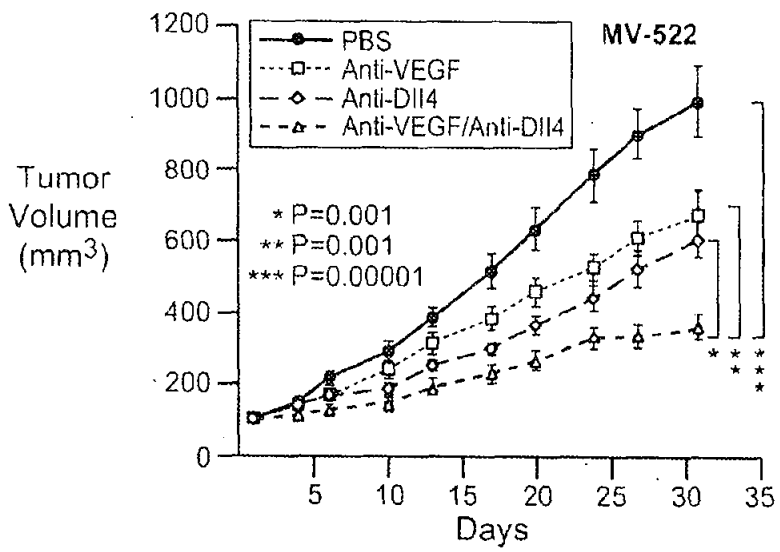
- (51) International Patent Classification:  
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2007/070516
- (22) International Filing Date: 6 June 2007 (06.06.2007)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/811,357 6 June 2006 (06.06.2006) US  
60/866,767 21 November 2006 (21.11.2006) 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).

- (71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): YAN, Minhong [US/US]; 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404 (US).
- (74) Agents: KALINOWSKI, Grant et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (US).

- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:  
14 February 2008

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT



(57) Abstract: The present invention provides methods of using a DLL4 modulator to modulate vascular development. Furthermore, methods of treatment using DLL4 modulators, such as DLL4 antagonists, are provided.

WO 2007/143689 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/070516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K38/17 A61K39/395

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)  
A61K

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         | <p>NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (D114) is critical for tumor growth and angiogenesis."<br/>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721<br/>&amp; 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006<br/>ISSN: 0197-016X<br/>abstract</p> <p>-----<br/>-/--</p> | 1-5,<br>10-25         |

☒ 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

7 November 2007

Date of mailing of the international search report

06/12/2007

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

Kania, Thomas

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/070516

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                       |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
| X                                                    | 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<br>ISSN: 0008-5472<br>the whole document | 6                     |
| 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<br>ISSN: 0962-8924                                                                                                                                                         |                       |
| 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<br>ISSN: 0006-4971                                                                                                                     |                       |
| A                                                    | TAVARES MARIA J ET AL: "Inhibition of vascular endothelium by the Notch-ligand delta-4 unveils a novel therapeutic target." BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 531a, XP009091788<br>& 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003<br>ISSN: 0006-4971            |                       |
| 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<br>ISSN: 0028-0836                                                                           |                       |
|                                                      | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/070516

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                       |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Category                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No.                 |
| A                                                    | CLAXTON S ET AL: "Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries" GENE EXPRESSION PATTERNS, ELSEVIER, vol. 5, no. 1, November 2004 (2004-11), pages 123-127, XP004631657<br>ISSN: 1567-133X<br>cited in the application                                                                          | 5,19                                  |
| 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<br>ISSN: 0028-0836<br>the whole document                                                                | 1-4,6-9,<br>20-25                     |
| 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<br>ISSN: 0028-0836<br>the whole document                                                                       | 1-4,<br>6-18,<br>20-25                |
| 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<br>ISSN: 0027-8424<br>the whole document | 1-9,<br>20-25                         |
| P,X                                                  | US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22)<br><br>the whole document                                                                                                                                                                                                                 | 1-4,7,8,<br>10-14,<br>16-18,<br>20-25 |
| E                                                    | WO 2007/070671 A (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21)<br>the whole document                                                                                                                                                                         | 1-4,<br>9-15,17,<br>18,20-25          |
| -/--                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/070516

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| T         | <p>SAINSON R C A ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?"</p> <p>TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE 2007 UNITED KINGDOM,</p> <p>vol. 13, no. 9, 2007, pages 389-395,</p> <p>XP002457727</p> <p>ISSN: 1471-4914</p>           |                       |
| T         | <p>THURSTON G ET AL: "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth"</p> <p>NATURE REVIEWS CANCER 2007 UNITED KINGDOM,</p> <p>vol. 7, no. 5, 2007, pages 327-331,</p> <p>XP002457728</p> <p>ISSN: 1474-175X 1474-1768</p> |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/070516

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

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

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

### Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2007/070516

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2006134121                             | A1                  | 22-06-2006                 | NONE                |
| WO 2007070671                             | A                   | 21-06-2007                 | NONE                |



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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
13 December 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2007/143689 A2

(51) International Patent Classification:  
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2007/070516

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

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

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

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): YAN, Minhong [US/US]; 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404 (US).

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

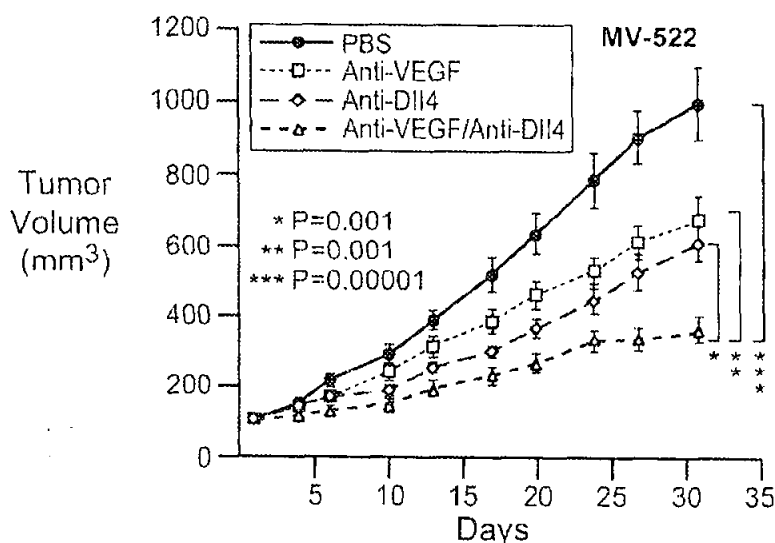
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, 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

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT



(57) Abstract: The present invention provides methods of using a DLL4 modulator to modulate vascular development. Furthermore, methods of treatment using DLL4 modulators, such as DLL4 antagonists, are provided.

WO 2007/143689 A2

## COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

### FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to compositions and methods that are useful for modulating vascular development. In part, the present invention relates to the use of Delta-like 4 (DLL4) antagonists for the diagnosis and treatment of disorders associated with angiogenesis.

### BACKGROUND OF THE INVENTION

Development of a vascular supply is a fundamental requirement for many 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 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 cells including pericytes for small capillaries, smooth muscle cells for larger vessels, and myocardial cells in the heart. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *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 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.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); and Garner A.,

"Vascular 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* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, *Lancet* 340:145-146 (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, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31).

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.* 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (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.* 331:1480-1487 (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.* 37:855-868 (1996).

Anti-VEGF neutralizing antibodies suppress the growth of a variety of human tumor cell lines in nude mice (Kim *et al.*, *Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56:921-924 (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 WO98/45331 and WO98/45332, both published October 15, 1998. One of the anti-VEGF antibodies, bevacizumab, has been approved by the FDA for use in combination with a chemotherapy regimen to treat metastatic colorectal cancer (CRC). And bevacizumab is being investigated in many ongoing clinical trials for treating various cancer indications.

In view of the role of angiogenesis in many diseases and disorders, it is desirable to have a means of modulating one or more of the biological effects causing these processes. 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 present invention is based in part on the discovery that vascular development is inhibited by treatment with an agent that modulates Delta-like 4 (interchangeably termed "DLL4") activation of the Notch receptor pathway. Treatment with a DLL4 antagonist resulted in increased endothelial cell (EC) proliferation, improper endothelial cell differentiation and improper arterial development in vasculature, including tumor vasculature. Strikingly, treatment with an anti-DLL4 antibody resulted in inhibition of

tumor growth in several different cancers. Accordingly, the invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture for modulating (e.g., promoting or inhibiting) processes involved in angiogenesis and for use in targeting pathological conditions associated with angiogenesis.

5 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 a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment.

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  
10 amount of an anti-DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment.

In one aspect, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist (such as 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 a DLL4 antagonist (such as 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 In one aspect, the invention provides methods for stimulating endothelial cell proliferation comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the subject has a pathological condition associated with angiogenesis (such as a tumor, a cancer and/or a cell proliferative disorder).

25 In one aspect, the invention provides methods for inhibiting endothelial cell differentiation comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the subject has a pathological condition associated with angiogenesis (such as a tumor, a cancer and/or a cell proliferative disorder).

30 In one aspect, the invention provides methods for inhibiting arterial development comprising administering an effective amount of DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the subject has a pathological condition associated with angiogenesis (such as a tumor, a cancer and/or a cell proliferative disorder).

In one aspect, the invention provides methods for inhibiting vascular perfusion comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the subject has a pathological condition associated with angiogenesis (such as a tumor, a cancer and/or a cell proliferative disorder).

5 In another aspect, the invention provides a method of enhancing the efficacy of an anti-angiogenic agent treatment in a subject having a pathological condition associated with angiogenesis, comprising administering to the subject an effective amount of DLL4 antagonist in combination with the anti-angiogenic agent. Such a method will be useful in treating disorders, for example cancers or intraocular neovascular diseases, especially those  
10 diseases or stages of the disorders that responded poorly to a treatment with the anti-angiogenic agent alone. The anti-angiogenic agent can be any agent capable of reducing or inhibiting angiogenesis, including VEGF antagonists such as anti-VEGF antibody.

In one aspect, the invention provides methods comprising administration of an effective amount of a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody) in combination  
15 with an effective amount of another therapeutic agent (such as an anti-angiogenesis agent). For example, DLL4 antagonists are used in combinations with anti-cancer agent or an anti-angiogenic agent to treat various neoplastic or non-neoplastic conditions. In one embodiment, the neoplastic or non-neoplastic condition is a pathological condition associated with angiogenesis. In some embodiments, the other therapeutic agent is an anti-  
20 angiogenic agent, an anti-neoplastic agent, and/or a chemotherapeutic agent.

The DLL4 antagonist can be administered serially or in combination with the other therapeutic agent that is effective for those purposes, either in the same composition or as separate compositions. The administration of the DLL4 antagonist and the other therapeutic agent (e.g., anti-cancer agent, anti-angiogenic agent) can be done simultaneously, e.g., as a  
25 single composition or as two or more distinct compositions, using the same or different administration routes. Alternatively, or additionally, the administration can be done sequentially, in any order. Alternatively, or additionally, the steps can be performed as a combination of both sequentially and simultaneously, in any order. In certain embodiments, intervals ranging from minutes to days, to weeks to months, can be present between the  
30 administrations of the two or more compositions. For example, the anti-cancer agent may be administered first, followed by the DLL4 antagonist. However, simultaneous administration or administration of the DLL4 antagonist first is also contemplated. Accordingly, in one aspect, the invention provides methods comprising administration of a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody), followed by administration of an anti-

angiogenic agent (such as an anti-VEGF antibody, such as bevacizumab). 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.

In certain aspects, the invention provides a method of treating a disorder (such as a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder) by administering effective amounts of an antagonist of DLL4 and/or an angiogenesis inhibitor(s) and one or more chemotherapeutic agents. 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 "Definitions." The administration of the DLL4 antagonist and the chemotherapeutic agent can be done simultaneously, e.g., as a single composition or as two or more distinct compositions, using the same or different administration routes. Alternatively, or additionally, the administration can be done sequentially, in any order. Alternatively, or additionally, the steps can be performed as a combination of both sequentially and simultaneously, 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 chemotherapeutic agent may be administered first, followed by the DLL4 antagonist. However, simultaneous administration or administration of the DLL4 antagonist first is also contemplated. Accordingly, in one aspect, the invention provides methods comprising administration of a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody), followed by administration of a chemotherapeutic agent. 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.

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

In one aspect, the invention provides methods for treating a disorder comprising administering an effective amount of a DLL4 agonist to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the disorder is associated with expression and/or activity of the DLL4-Notch receptor pathways (such as increased activity of the DLL4-Notch receptor pathway). In some embodiments, the disorder is a disorder wherein angiogenesis, neovascularization and/or hypertrophy is desired, e.g. vascular trauma, wounds, lacerations, incisions, burns, ulcers (e.g., diabetic ulcers, pressure ulcers, haemophilic ulcers, varicose

29

ulcers), tissue growth, weight gain, peripheral arterial disease, induction of labor, hair growth, epidermolysis bullosa, retinal atrophy, bone fractures, bone spinal fusions, meniscal tears, etc. In some embodiments, the disorder is a disorder wherein inhibition of angiogenesis is desired. In some embodiments, the DLL4 agonist is DBZ.

5        DLL4 antagonists and agonists are known in the art and some are described and exemplified herein. In some embodiments, the DLL4 antagonist is a molecule which binds to DLL4 and neutralizes, blocks, inhibits, abrogates, reduces or interferes with one or more aspects of DLL4-associated effect. In some embodiments, the DLL4 antagonist is a molecule which binds to Notch receptor (such as Notch1, Notch2, Notch3 and/or Notch4)  
10        and neutralizes, blocks, inhibits, abrogates, reduces or interferes with one or more aspects of DLL4-associated effects. In some embodiments, the DLL4 antagonist is capable of promoting endothelial cell proliferation, inhibiting endothelial cell differentiation, inhibiting arterial development and/or reducing vascular perfusion. As is well-established in the art, endothelial cell proliferation, endothelial cell differentiation, arterial development and  
15        vascular function (such as vascular perfusion) can be assessed using any of a variety of assays (some of which are described and exemplified herein), and expressed in terms of a variety of quantitative values. In some embodiments, the ability of a DLL4 antagonist to promote endothelial cell proliferation, inhibit endothelial cell differentiation, inhibit arterial development and/or reduce vascular function (such as reduced vascular perfusion) is  
20        assessed relative to level of endothelial cell proliferation, endothelial cell differentiation, arterial development and/or vascular function (such as vascular perfusion) in the absence of treatment with the DLL4 antagonist. In some embodiments, ability to promote endothelial cell proliferation, inhibit endothelial cell differentiation, inhibit arterial development and/or reduce vascular function (such as reduced vascular perfusion) is determined in an in vitro  
25        assay (such as the HUVEC assay described herein). In some embodiments, ability to promote endothelial cell proliferation, inhibit endothelial cell differentiation, inhibit arterial development and/or reduce vascular function (such as reduced vascular perfusion) is determined in an in vivo assay (such as the mouse retinal development assay described herein).

30        The DLL4 antagonist may be an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the anti-DLL4 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')<sub>2</sub>, or scFv. In some embodiments, the antibody comprises the heavy and light chain variable regions shown in Table 1.

Table 1

VH

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYI  
SPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFD  
YWGQGTLLVT (SEQ ID NO: 1)

VL

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS  
FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 2)

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 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 embodiment, the DLL4 antagonist is a DLL4 immunoadhesin.

In one aspect, the invention provides compositions comprising one or more DLL4 antagonist and a carrier. In one embodiment, the carrier is pharmaceutically acceptable. In some embodiments, the DLL4 antagonist is an anti-DLL4 antibody.

In one aspect, the invention provides a composition for use in treating a tumor, a cancer and/or a cell proliferative disorder comprising an effective amount of a DLL4 antagonist and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said use comprises simultaneous or sequential administration of an anti-angiogenesis agent. In some embodiments, the DLL4 antagonist is an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF antibody (such as bevacizumab).

In one aspect, the invention provides a composition for use in treating a tumor, a cancer and/or a cell proliferative disorder comprising an effective amount of a DLL4 antagonist and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said use comprises simultaneous or sequential administration of an anti-cancer agent. In some embodiments, the DLL4 antagonist is an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the anti-cancer agent is a chemotherapeutic agent. In some embodiments, the use further comprises simultaneous or sequential administration of an anti-angiogenesis agent. In some embodiments, the DLL4 antagonist is an anti-DLL4 antibody. In some embodiments, the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF antibody (such as bevacizumab).

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 DLL4 antagonists or DLL4 agonists.

In one aspect, the invention provides a kit comprising a first container comprising a composition comprising one or more DLL4 antagonists or DLL4 agonists; and a second container comprising a buffer. In one embodiment, the buffer is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, the DLL4 antagonist is an anti-DLL4 antibody.

In another aspect, the present invention provides a method for preparing a composition comprising admixing a therapeutically effective amount of a DLL4 antagonist or DLL4 agonist with a pharmaceutically acceptable carrier.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGURE 1: DLL4-mediated Notch signaling regulates 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

29

sprouting of HUVECs in the presence of SF conditioned medium (c). d, h, Systemic 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 (isolectin staining) (d). Ki67 staining shows increased EC proliferation in the neonatal retinas treated with anti-DLL4 antibody (h). c, 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 µg/ml and 0.08 µM, respectively (a-c, e-g).

Figure 2: DLL4-mediated Notch signaling regulates 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 TGFβ2 by Notch. Quantitative PCR analysis of TGFβ2 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 isolectin. Neonatal mice were treated as described in Fig. 1d. d, Confocal images of adult mouse retinas stained with ASMA and isolectin. 8 week-old mice were treated with PBS or anti-DLL4 antibody (10 mg/kg, twice weekly) for two weeks.

Figure 3: 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 4: DLL4/Notch is 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 µmol/kg daily for 5 days) (c, f, i, l) mice. As shown by H&E (a, b, c) and Alcian Blue staining (d, e,

24

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 5: Characterization of anti-DLL4 antibody. a, Epitope mapping of anti-DLL4 antibody (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 6: 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

### *General techniques*

The techniques and procedures described or referenced herein are generally well 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 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*

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 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.

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" 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" generally refers to an amino acid sequence found in a naturally occurring Notch receptor.

"DLL4 nucleic acid" is RNA or DNA that encodes a DLL4 polypeptide, as defined above, or which hybridizes to such DNA or RNA and remains stably bound to it under

stringent hybridization conditions and is greater than about 10 nucleotides in length.

Stringent conditions are those which (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example, 0.15 M NaCl/0.015 M sodium citrate/0.1% NaDodSO<sub>4</sub> at 50°C, or

(2) use during hybridization a denaturing agent such as formamide, for example, 50%

5 (vol/vol) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1%

polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM NaCl<sub>2</sub>, 75 mM sodium citrate at 42°C.

A "chimeric DLL4" molecule is a polypeptide comprising full-length DLL4 or one or more domains thereof fused or bonded to heterologous polypeptide. The chimeric DLL4  
10 molecule will generally share at least one biological property in common with naturally occurring DLL4. An example of a chimeric DLL4 molecule is one that is epitope tagged for purification purposes. Another chimeric DLL4 molecule is a DLL4 immunoadhesin.

The term "DLL4 immunoadhesin" is used interchangeably with the term "DLL4-immunoglobulin chimera", and refers to a chimeric molecule that combines at least a  
15 portion of a DLL4 molecule (native or variant) with an immunoglobulin sequence. The immunoglobulin sequence preferably, but not necessarily, is an immunoglobulin constant domain (Fc region). Immunoadhesins can possess many of the valuable chemical and biological properties of human antibodies. Since immunoadhesins can be constructed from a human protein sequence with a desired specificity linked to an appropriate human  
20 immunoglobulin hinge and constant domain (Fc) sequence, the binding specificity of interest can be achieved using entirely human components. Such immunoadhesins are minimally immunogenic to the patient, and are safe for chronic or repeated use. In some embodiments, the Fc region is a native sequence Fc region. In some embodiments, the Fc region is a variant Fc region. In some embodiments, the Fc region is a functional Fc region.

25 Examples of homomultimeric immunoadhesins which have been described for therapeutic use include the CD4-IgG immunoadhesin for blocking the binding of HIV to cell-surface CD4. Data obtained from Phase I clinical trials, in which CD4-IgG was administered to pregnant women just before delivery, suggests that this immunoadhesin may be useful in the prevention of maternal-fetal transfer of HIV (Ashkenazi *et al.*, *Intern. Rev. Immunol.* 10:219-227 (1993)). An immunoadhesin which binds tumor necrosis factor (TNF) has also been developed. TNF is a proinflammatory cytokine which has been shown to be a major mediator of septic shock. Based on a mouse model of septic shock, a TNF receptor immunoadhesin has shown promise as a candidate for clinical use in treating septic shock (Ashkenazi, A. *et al. PNAS USA* 88:10535-10539 (1991)). ENBREL® (etanercept),  
30

an immunoadhesin comprising a TNF receptor sequence fused to an IgG Fc region, was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), on November 2, 1998, for the treatment of rheumatoid arthritis. The new expanded use of ENBREL® in the treatment of rheumatoid arthritis was approved by FDA on June 6, 2000. For recent information on TNF blockers, including ENBREL®, see Lovell *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 342:763-169 (2000), and accompanying editorial on p810-811; and Weinblatt *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 340:253-259 (1999); reviewed in Maini and Taylor, *Annu. Rev. Med.* 51:207-229 (2000).

If the two arms of the immunoadhesin structure have different specificities, the immunoadhesin is called a "bispecific immunoadhesin" by analogy to bispecific antibodies. Dietsch *et al.*, *J. Immunol. Methods* 162:123 (1993) describe such a bispecific immunoadhesin combining the extracellular domains of the adhesion molecules, E-selectin and P-selectin, each of which selectins is expressed in a different cell type in nature. Binding studies indicated that the bispecific immunoglobulin fusion protein so formed had an enhanced ability to bind to a myeloid cell line compared to the monospecific immunoadhesins from which it was derived.

The term "heteroadhesin" is used interchangeably with the expression "chimeric heteromultimer adhesin" and refers to a complex of chimeric molecules (amino acid sequences) in which each chimeric molecule combines a biologically active portion, such as the extracellular domain of each of the heteromultimeric receptor monomers, with a multimerization domain. The "multimerization domain" promotes stable interaction of the chimeric molecules within the heteromultimer complex. The multimerization domains may interact via an immunoglobulin sequence, leucine zipper, a hydrophobic region, a hydrophilic region, or a free thiol that forms an intermolecular disulfide bond between the chimeric molecules of the chimeric heteromultimer. The multimerization domain may comprise an immunoglobulin constant region. In addition a multimerization region may be engineered such that steric interactions not only promote stable interaction, but further promote the formation of heterodimers over homodimers from a mixture of monomers. "Protuberances" are constructed by replacing small amino acid side chains from the interface of the first polypeptide with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the protuberances are optionally created on the interface of the second polypeptide by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). The immunoglobulin sequence preferably, but not necessarily, is an immunoglobulin constant domain. The immunoglobulin moiety in the

chimeras of the present invention may be obtained from IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> or IgG<sub>4</sub> subtypes, IgA, IgE, IgD or IgM, but preferably IgG<sub>1</sub> or IgG<sub>3</sub>.

The term "Fc region" herein is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain, including native sequence Fc regions and variant Fc regions.

- 5 Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The C-terminal lysine (residue 447 according to the EU numbering system) of the Fc region may be removed, for example, during production or purification of the antibody, or by
- 10 recombinantly engineering the nucleic acid encoding a heavy chain of the antibody. Accordingly, a composition of intact antibodies may comprise antibody populations with all K447 residues removed, antibody populations with no K447 residues removed, and antibody populations having a mixture of antibodies with and without the K447 residue.

- Unless indicated otherwise, herein the numbering of the residues in an
- 15 immunoglobulin heavy chain is that of the EU index as in Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), expressly incorporated herein by reference. The "EU index as in Kabat" refers to the residue numbering of the human IgG1 EU antibody.

- A "functional Fc region" possesses an "effector function" of a native sequence Fc
- 20 region. Exemplary "effector functions" include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g. B cell receptor; BCR), etc. Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (e.g. an antibody variable domain) and can be assessed using various assays as
- 25 herein disclosed, for example.

- A "native sequence Fc region" comprises an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of an Fc region found in nature. Native sequence human Fc regions include a native sequence human IgG1 Fc region (non-A and A allotypes); native sequence human IgG2 Fc region; native sequence human IgG3 Fc region; and native sequence human
- 30 IgG4 Fc region as well as naturally occurring variants thereof.

A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue of at least one amino acid modification, preferably one or more amino acid substitution(s). Preferably, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc region or to the Fc region of a



21

parent polypeptide, e.g. from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably from about one to about five amino acid substitutions in a native sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% homology with a native sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, and most preferably at least about 90% homology therewith, more preferably at least about 95% homology therewith.

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

The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably in the broadest sense and include monoclonal antibodies (for 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 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 distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called complementarity-determining regions (CDRs) or hypervariable regions 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 domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a  $\beta$ -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases

20

forming part of, the  $\beta$ -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., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD

5 (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, 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')<sub>2</sub> 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-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 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.

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 free thiol group. F(ab')<sub>2</sub> 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.

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

31

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 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  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , and  $\mu$ , 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 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')<sub>2</sub>, 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 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 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.

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.

|    | Loop                | Kabat    | AbM      | Chothia  | Contact  |
|----|---------------------|----------|----------|----------|----------|
|    | -----               | ---      | -----    | -----    |          |
|    | L1                  | L24-L34  | L24-L34  | L26-L32  | L30-L36  |
|    | L2                  | L50-L56  | L50-L56  | L50-L52  | L46-L55  |
| 5  | L3                  | L89-L97  | L89-L97  | L91-L96  | L89-L96  |
|    | H1                  | H31-H35B | H26-H35B | H26-H32  | H30-H35B |
|    | (Kabat Numbering)   |          |          |          |          |
|    | H1                  | H31-H35  | H26-H35  | H26-H32  | H30-H35  |
|    | (Chothia Numbering) |          |          |          |          |
| 10 | H2                  | H50-H65  | H50-H58  | H53-H55  | H47-H58  |
|    | 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  
 15 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  
 20 population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies  
 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-  
 25 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  
 30 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

37

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

34

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); Hurle 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.

"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).

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).

5       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.

10       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  
15 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).

20       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  
25 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  
30 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

36

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. *PNAS (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 Kinet, *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.

5       “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*  
10   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).

15       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  
20   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.

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  
25   antibodies substantially or completely inhibit the biological activity of the antigen.

“Chronic” administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. “Intermittent” administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

30       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.

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 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, 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, 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. These disorders include both non-neoplastic and neoplastic conditions. Neoplastics include but are not limited to 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 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 (rubeosis), ocular neovascular disease, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), 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, 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, 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 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 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 (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 time necessary, to achieve the desired therapeutic or prophylactic result.

A "therapeutically effective amount" of a substance/molecule 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 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 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., At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents e.g. methotrexate, adriamycin, vinca  
 5 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.  
 10 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  
 15 pipsulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a  
 20 camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scoplectin, and 9-aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic  
 25 analogues, KW-2189 and CBI-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and  
 30 ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e. g., calicheamicin, especially calicheamicin gammaII and calicheamicin omegaII (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 antiobiotic chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins,

41

- 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,
- 5 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-mercaptopurine, thiamiprine,
- 10 thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitio stanol, mepitio stanane, testolactone; anti-adrenals such as aminogluthimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil;
- 15 amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diazi quone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products,
- 20 Eugene, OR); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triazi quone; 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,
- 25 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);
- 30 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

112

CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN<sup>TM</sup>) combined with 5-FU and leucovorin.

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 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 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- $\alpha$ , 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; 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 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 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 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 doxorubicin is (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- $\alpha$ -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione.

An "intraocular neovascular disease" is a disease characterized by ocular neovascularization. Examples of intraocular neovascular diseases include, but are not limited to, proliferative retinopathies, choroidal neovascularization (CNV), age-related macular degeneration (AMD), diabetic and other ischemia-related retinopathies, diabetic macular edema, pathological myopia, von Hippel-Lindau disease, histoplasmosis of the eye, retinal vein occlusions, including Central Retinal Vein Occlusion (CRVO), corneal neovascularization, retinal neovascularization, etc.

The "pathology" of a disease includes all phenomena that compromise the well-being of the patient. For cancer, this includes, without limitation, abnormal or uncontrollable cell growth, metastasis, interference with the normal functioning of neighboring cells, release of cytokines or other secretory products at abnormal levels, suppression or aggravation of inflammatory or immunological response, etc.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

44

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN<sup>TM</sup>, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS<sup>TM</sup>.

A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as a DLL4 polypeptide or antibody thereto) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

The terms "VEGF" and "VEGF-A" are used interchangeably to refer to the 165-amino acid vascular endothelial cell growth factor and related 121-, 145-, 183-, 189-, and 206- amino acid vascular endothelial cell growth factors, as described by Leung et al. Science, 246:1306 (1989), Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), and, Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5):853-865 (2001), together with the naturally occurring allelic and processed forms thereof.

A "VEGF antagonist" refers to a molecule capable of neutralizing, blocking, inhibiting, abrogating, reducing or interfering with VEGF activities including its binding to one or more VEGF receptors. VEGF antagonists include anti-VEGF antibodies and antigen-binding fragments thereof, receptor molecules and derivatives which bind specifically to VEGF thereby sequestering its binding to one or more receptors, anti-VEGF receptor antibodies and VEGF receptor antagonists such as small molecule inhibitors of the VEGFR tyrosine kinases, and fusions proteins, e.g., VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-gelonin (Peregrine). VEGF antagonists also include antagonist variants of VEGF, antisense molecules directed to VEGF, RNA aptamers, and ribozymes against VEGF or VEGF receptors.

An "anti-VEGF antibody" is an antibody that binds to VEGF with sufficient affinity and specificity. The anti-VEGF antibody can be used as a therapeutic agent in targeting and



interfering with diseases or conditions wherein the VEGF activity is involved. See, e.g., U.S. Patents 6,582,959, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202, WO2005/044853; ; EP 0666868B1; US Patent Applications 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208, and 20050112126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); and WO2005012359. An anti-VEGF antibody will usually not bind to other VEGF homologues such as VEGF-B or VEGF-C, nor other growth factors such as PlGF, PDGF or bFGF. The anti-VEGF antibody "Bevacizumab (BV)", also known as "rhuMAb VEGF" or "Avastin®", is a recombinant humanized anti-VEGF monoclonal antibody generated according to Presta et al. Cancer Res. 57:4593-4599 (1997). It comprises mutated human IgG1 framework regions and antigen-binding complementarity-determining regions from the murine anti-hVEGF monoclonal antibody A.4.6.1 that blocks binding of human VEGF to its receptors. Approximately 93% of the amino acid sequence of Bevacizumab, including most of the framework regions, is derived from human IgG1, and about 7% of the sequence is derived from the murine antibody A4.6.1. Bevacizumab has a molecular mass of about 149,000 daltons and is glycosylated. Bevacizumab and other humanized anti-VEGF antibodies, including the anti-VEGF antibody fragment "ranibizumab", also known as "Lucentis®", are further described in U.S. Pat. No. 6,884,879 issued February 26, 2005.

The term "biological activity" and "biologically active" with regard to a DLL4 polypeptide refer to physical/chemical properties and biological functions associated with DLL4. In some embodiments, DLL4 "biological activity" includes one or more of: binding a Notch receptor (eg, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), activating a Notch receptor, and activating a Notch receptor downstream molecular signaling. In this context, the term "modulate" includes both promotion and inhibition.

A "DLL4 antagonist" refers to a molecule capable of neutralizing, blocking, inhibiting, abrogating, reducing or interfering with the activities of a DLL4 including, for example, 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. DLL4 antagonists include antibodies and antigen-binding fragments thereof, proteins, peptides, glycoproteins, glycopeptides, glycolipids, polysaccharides, oligosaccharides, nucleic acids, bioorganic molecules, peptidomimetics, pharmacological agents and their metabolites, transcriptional and translation control sequences, and the like. Antagonists also include small molecule

46

inhibitors of a protein, and fusions proteins, receptor molecules and derivatives which bind specifically to protein thereby sequestering its binding to its target, antagonist variants of the protein, siRNA molecules directed to a protein, antisense molecules directed to a protein, RNA aptamers, and ribozymes against a protein. In some embodiments, the DLL4 antagonist is a molecule which binds to DLL4 and neutralizes, blocks, inhibits, abrogates, reduces or interferes with a biological activity of DLL4. In some embodiments, the DLL4 antagonist is a molecule which binds to Notch receptor (such as Notch1, Notch2, Notch3 and/or Notch4) and neutralizes, blocks, inhibits, abrogates, reduces or interferes with a biological activity of DLL4. In some embodiments, the DLL4 antagonist modulates 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.

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". 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 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)), 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

41

active parent form. See, e.g., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" 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

5 include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, beta-lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-

10 converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic 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 "angiogenic factor or agent" is a growth factor which stimulates the development of blood vessels, e.g., promotes angiogenesis, endothelial cell growth, stability of blood

15 vessels, and/or vasculogenesis, etc. For example, angiogenic factors, include, but are not limited to, e.g., VEGF and members of the VEGF family, PlGF, PDGF family, fibroblast growth factor family (FGFs), TIE ligands (Angiopoietins), ephrins, ANGPTL3, DLL4, etc. It would also include factors that accelerate wound healing, such as growth hormone, insulin-like growth factor-I (IGF-I), VEGF, epidermal growth factor (EGF), CTGF and

20 members of its family, and TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . See, e.g., Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (e.g., Table 1 listing angiogenic factors); and, Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003).

25 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

30 antibody or other antagonist to an angiogenic agent as defined above, e.g., antibodies to VEGF, antibodies to VEGF receptors, 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).

***Methods and compositions of the invention***

The present invention is based in part on the discovery that vascular development is inhibited by treatment with an agent that modulates Delta-like 4 (interchangeably termed "DLL4") activation of the Notch receptor pathway. Treatment with a DLL4 antagonist resulted in increased endothelial cell (EC) proliferation, improper endothelial cell differentiation and improper arterial development in vasculature, including tumor vasculature. Strikingly, treatment with an anti-DLL4 antibody resulted in inhibition of tumor growth in several different cancers. Without being bound by theory, it is believed that increased EC proliferation and impaired EC differentiation results in improper tumor vascular function, leading to inhibition of tumor growth. Accordingly, DLL4 antagonists are believed to demonstrate a broadly efficacious approach for the treatment of cancer.

Accordingly, the invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture for modulating (e.g., promoting or inhibiting) processes involved in angiogenesis and for use in targeting pathological conditions associated with angiogenesis, such as cancer.

It is contemplated that, according to the present invention, the DLL4 modulators and/or combinations of DLL4 modulators and other therapeutic agents can be used to treat various disorders.

Accordingly, the invention encompasses methods for inhibiting angiogenesis using an effective amount of a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody or a DLL4 immunoadhesin) to inhibit DLL4 activation of Notch receptors (such as Notch1, Notch2, Notch3, and/or Notch4). In another aspect, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the DLL4 antagonist is capable of promoting endothelial cell proliferation, inhibits endothelial cell differentiation, inhibits arterial development and/or reduces vascular perfusion. In another aspect, the invention provides methods for stimulating endothelial cell proliferation, inhibiting endothelial cell

Ud

differentiation, inhibiting arterial development and/or inhibiting tumor vascular perfusion comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment.

5 Examples of neoplastic disorders to be treated with a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody) include, but are not limited to, those described herein under the terms "cancer" and "cancerous." Non-neoplastic conditions that are amenable to treatment with antagonists useful in the invention, but are not limited to, e.g., undesired or aberrant hypertrophy, arthritis, rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, psoriatic plaques, sarcoidosis, atherosclerosis, atherosclerotic plaques, edema from myocardial infarction, diabetic and  
10 other proliferative retinopathies including retinopathy of prematurity, retrolental 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 (rubeosis), ocular neovascular disease, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma,  
15 hemangioma, angiofibroma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), 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,  
20 osteoarthritis (OA), refractory ascites, polycystic ovarian disease, 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), obesity, adipose tissue  
25 mass growth, hemophilic joints, hypertrophic scars, inhibition of hair growth, Osler-Weber syndrome, pyogenic granuloma retrolental fibroplasias, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, synovitis, dermatitis, preeclampsia, ascites, pericardial effusion (such as that associated with pericarditis), and pleural effusion. Further examples of disorders to be treated with a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody) include an epithelial or  
30 cardiac disorder.

Modulators of DLL4, e.g., agonists or activators of DLL4, can be utilized for treatment of pathological disorders. In some embodiments, modulators of DLL4, e.g., agonists of DLL4, can be utilized in the treatment of pathological disorders where inhibition of angiogenesis is desired. Modulators of DLL4, e.g. DLL agonists, can also be used for

70

treatment of pathological disorders where angiogenesis or neovascularization and/or hypertrophy is desired, which include, but are not limited to, e.g., vascular trauma, wounds, lacerations, incisions, burns, ulcers (e.g., diabetic ulcers, pressure ulcers, haemophilic ulcers, varicose ulcers), tissue growth, weight gain, peripheral arterial disease, induction of labor, hair growth, epidermolysis bullosa, retinal atrophy, bone fractures, bone spinal fusions, meniscal tears, etc.

#### Combination Therapies

As indicated above, the invention provides combined therapies in which a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody) or a DLL4 agonist is administered with another therapy. For example, DLL4 antagonists are used in combinations with anti-cancer agent or an anti-angiogenic agent 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 DLL4 antagonist 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 DLL4 antagonist (or DLL4 agonist) and the other therapeutic agent (e.g., anti-cancer agent, anti-angiogenic agent) can be done simultaneously, e.g., as a single composition or as two or more distinct compositions using the same or different administration routes. Alternatively, or additionally, the administration can be done sequentially, in any order. Alternatively, or additionally, the steps can be performed as a combination of both sequentially and simultaneously, 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 antagonist. However, simultaneous administration or administration of the DLL4 antagonist first is also contemplated. Accordingly, in one aspect, the invention provides methods comprising administration of a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody), followed by administration of an anti-angiogenic agent (such as anti-VEGF). 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.

The effective amounts of therapeutic agents administered in combination with a DLL4 antagonist (or DLL4 agonist) will be at the physician's or veterinarian's discretion.

5 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 DLL4 antagonist. 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.

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

15 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.

20 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, a DLL4 antagonist 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 DLL4 antagonist, the VEGF antagonist, and an anti-angiogenesis agent.

2

In certain aspects of the invention, other therapeutic agents useful for combination tumor therapy with a DLL4 antagonist (or DLL4 agonist) 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 one aspect, the invention provides a method of treating a disorder (such as a tumor, a cancer, or a cell proliferative disorder) by administering effective amounts of an antagonist of DLL4 (or DLL4 agonist) and/or an angiogenesis inhibitor(s) and one or more chemotherapeutic agents. 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 "Definitions." The administration of the DLL4 antagonist and the chemotherapeutic agent can be done simultaneously, e.g., as a single composition or as two or more distinct compositions, using the same or different administration routes. Alternatively, or additionally, the administration can be done sequentially, in any order. Alternatively, or additionally, the steps can be performed as a combination of both sequentially and simultaneously, 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 chemotherapeutic agent may be administered first, followed by the DLL4 antagonist. However, simultaneous administration or administration of the DLL4 antagonist first is also contemplated. Accordingly, in one aspect, the invention provides methods comprising administration of a DLL4 antagonist (such as an anti-DLL4 antibody), followed by administration of a chemotherapeutic agent. 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.

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.

### Relapse Tumor Growth

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 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 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 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 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 DLL4 antagonist (or DLL4 agonist) 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 DLL4 antagonists are administered simultaneously with cancer therapy. Alternatively, or additionally, the DLL4 antagonist therapy alternates with another cancer therapy, which can be performed in any 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

81

antagonist. The anti-angiogenesis agent includes those known in the art and those found under the Definitions herein. In one embodiment, the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF neutralizing antibody or fragment (e.g., humanized A4.6.1, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). See, e.g., U.S.

5 Patents 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; US Patent Applications 20030206899, 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 a DLL4 antagonist for blocking or reducing relapse tumor growth or relapse  
10 cancer cell growth, e.g., see section entitled Combination Therapies herein.

#### DLL4

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,  
15 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); MNL (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  
20 (amino acids 440-476); EGF-Like (amino acids 480-518); transmembrane (amino acids 529-551); cytoplasmic domain (amino acids 552-685). DLL4 nucleic acid and amino acid sequences are known in the art and are further discussed herein. 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 DLL4 can be used.  
25 The accession number of human DLL4 is NM\_019074, and the accession number of mouse DLL4 is NM\_019454.

DLL4 binds the Notch receptors. The evolutionarily conserved Notch pathway is a key regulator of many developmental processes as well as postnatal self-renewing organ systems. From invertebrates to mammals, Notch signaling guides cells through a myriad of  
30 cell fate decisions and influences proliferation, differentiation and apoptosis (Miele and Osborne, 1999). The Notch family consists of structurally conserved cell surface receptors that are activated by membrane-bound ligands of the DSL gene family (named for Delta and Serrate from Drosophila and Lag-2 from C.elegans). Mammals have four receptors (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) and five ligands (Jag1, Jag2, DLL1, Dll3 and DLL4).

Upon activation by ligands presented on neighboring cells, Notch receptors undergo successive proteolytic cleavages. This leads to the release of the Notch Intra-Cellular Domain (NICD), which translocates into the nucleus and forms a transcriptional complex with the DNA binding protein, RBP-Jk also known as CSL [for CBF1/Su(H)/Lag-1] and other transcriptional cofactors. The primary target genes of Notch activation include the HES (Hairy/Enhancer of Split) gene family and HES-related genes (Hey, CHF, HRT, HESR), which in turn regulate the downstream transcriptional effectors in a tissue and cell-type specific manner (Iso et al., 2003; Li and Harris, 2005).

#### **DLL4 Modulators**

10 Modulators of DLL4 are molecules that modulate the activity of DLL4, e.g., agonists and antagonists. The term "DLL4 agonist" is used to refer to peptide and non-peptide analogs of DLL4 (such as the multimerized DLL4 described herein), and to other agents provided they have the ability to signal through a native Notch receptor (e.g., Notch1, Notch2, Notch3, Notch4). The term "agonist" is defined in the context of the biological role of a Notch receptor. In certain embodiments, agonists possess the biological activities of a DLL4, as defined above, such as binding a Notch receptor (e.g., Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), activating a Notch receptor, and activating a Notch receptor downstream molecular signaling. In some embodiments, DLL4 agonists inhibit endothelial cell proliferation, promote epithelial cell differentiation, and/or promote arterial development. In some embodiments, DLL4 agonists inhibit vascular development.

DLL4 modulators are known in the art, and some are described and exemplified herein. An exemplary and non-limiting list of DLL4 antagonists (such as an anti-DLL4 antibody and a DLL4 immunoadhesin) contemplated is provided herein under "Definitions."

25 The modulators useful in the present invention can be characterized for their physical/chemical properties and biological functions by various assays known in the art. In some embodiments, DLL4 antagonists are characterized for any one or more of: binding to DLL4, binding to Notch receptor, 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, DLL4 agonists are characterized for any one or more of: binding a Notch receptor (e.g., Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), activating a Notch receptor, activating a Notch receptor downstream molecular signaling, inhibiting endothelial cell proliferation, promoting epithelial cell differentiation, and/or promoting arterial development. Methods for characterizing DLL4 antagonists and agonists are known in the art, and some are described and exemplified herein.

#### Antibodies

DLL4 antibodies are known in the art and some are described and exemplified herein. The anti-DLL4 antibodies are preferably monoclonal. Also encompassed within the scope of the invention are Fab, Fab', Fab'-SH and F(ab')<sub>2</sub> 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 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 can be made using the hybridoma method first described by Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), or may be 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) 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 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. Animals are boosted until titer plateaus.

- 5           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)).

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

- 15           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  
20   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)).

- 25           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).

- 30           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.

5 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 can be made by using combinatorial libraries to screen for synthetic antibody clones with the desired activity or activities. In principle, synthetic  
10 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  
15 are then eluted from the antigen, and can be further enriched by additional cycles of antigen adsorption/elution. Any of the anti-DLL4 antibodies 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.,  
20 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).  
25 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  
30 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  
5 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  
10 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 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  
15 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).

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,  
20 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 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  
25 DLL4 immunization gives rise to B cells producing human antibodies against DLL4. The generation of human antibody-producing transgenic mice is described below.

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  
30 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 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 obtained from a variety of animal species, such as human, mouse, rat, lagomorpha, luprine, canine, feline, porcine, bovine, equine, and avian species, etc.

- 5 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 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.,  
10 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  
15 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-  
20 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  
25 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  
30 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 V<sub>k</sub> and V<sub>λ</sub> 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 V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> 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 V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> 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 V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> repertoires are cloned separately, one into a phagemid and the other into a phage vector. The two libraries 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<sup>12</sup> clones). Both vectors contain in vivo recombination signals so that the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> 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 (K<sub>d</sub><sup>-1</sup> of about 10<sup>-8</sup> 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 V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> DNAs with 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 V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> 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 moderate affinity (K<sub>d</sub>-1 of about 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>), 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 can be performed by randomly mutating one or more CDRs, e.g. using PCR with primers

5 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 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

10 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<sup>-9</sup> M range.

DLL4 nucleic acid and amino acid sequences are known in the art and are further

15 discussed herein. 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

20 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

25 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.

30 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,

63

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,  $\text{CaPO}_4$  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 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.

611

Alternatively, DLL4 can be used to coat the wells of adsorption plates, expressed 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.

5       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. 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-  
10   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 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.

15       The efficiency of selection depends on many factors, including the kinetics of dissociation during washing, and whether multiple antibody fragments on a single phage 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  
20   phage through multivalent interactions, but favors rebinding of phage that has dissociated. The selection of antibodies with slow dissociation kinetics (and good binding affinities) 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).

25       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 (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  
30   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 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



61

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  
5 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  
10 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  
15 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)  
20 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 is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g. by using  
25 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  
30 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 can be combined with known DNA sequences  
encoding heavy chain and/or light chain constant regions (e.g. the appropriate DNA  
35 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

66

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 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.

#### *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')<sub>2</sub> fragments (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')<sub>2</sub> fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragment with increased in vivo half-life comprising a salvage receptor binding epitope residues are described in U.S. Pat. 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

67

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  
5 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.

*Humanized Antibodies*

The present invention encompasses humanized antibodies. Various methods for humanizing non-human antibodies are known in the art. For example, a humanized  
10 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; Verhoeyen et al. (1988)  
15 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  
20 some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

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  
25 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  
30 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.

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

68

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 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 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).

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 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 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 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 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- $\alpha$ , vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')<sub>2</sub> 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 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. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829 published May 13, 1993, and in Trauncker 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

30

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

5 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

10 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

15 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,

20 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 CH3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side

25 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

30 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

21

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.

5           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')<sub>2</sub> fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize  
10           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  
15           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')<sub>2</sub> molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to  
20           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  
25           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 homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody  
30           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)<sub>n</sub> -VD2-(X2)<sub>n</sub> -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 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*

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 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.

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 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 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 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-acylgalactosamine, galactose,

or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

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).

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 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 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 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 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 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 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 2 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 2, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 2

| Original<br>Residue | Exemplary<br>Substitutions             | Preferred<br>Substituti<br>ons |
|---------------------|----------------------------------------|--------------------------------|
| 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;<br>Phe; Norleucine | Leu                            |
| Leu (L)             | Norleucine; Ile; Val;<br>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;<br>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:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these  
10 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 properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way  
15 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 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity  
20 (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 of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues  
25 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.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are  
30 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 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, thereby generating a Fc region variant. The Fc region variant may comprise a human Fc region sequence (e.g., a human IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> or IgG<sub>4</sub> Fc region) comprising an amino acid modification (e.g. a substitution) at one or  
5 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 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  
10 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  
15 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  
20 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.  
25 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 can be further modified to contain additional nonproteinaceous  
30 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,

34

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 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, 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.

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.

Anti-DLL4 antibodies possessing the unique properties described herein can be obtained by screening anti-DLL4 hybridoma clones for the desired properties by any convenient method, some of which are described and exemplified herein. 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.

In one embodiment, the antibody is 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 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. 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 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. *PNAS (USA)* 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 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*

5 For recombinant production of an antibody, 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 of the antibody). Many vectors are  
10 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 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.

15 a. Generating antibodies using prokaryotic host cells:

i. Vector Construction

Polynucleotide sequences encoding polypeptide components of the antibody can be obtained using standard recombinant techniques. Desired polynucleotide sequences may be isolated and sequenced from antibody producing cells such as hybridoma cells.  
20 Alternatively, polynucleotides can be synthesized using nucleotide synthesizer or PCR techniques. Once obtained, sequences encoding the polypeptides are 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  
25 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 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  
30 promoter, a ribosome binding site (RBS), a signal sequence, the heterologous nucleic acid insert and a transcription termination sequence.

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 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 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  $\lambda$ GEM<sup>TM</sup>-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 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. 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  $\beta$ -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

83

WO 2007/143689

PCT/US2007/070516

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  
5 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  
10 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, PclB, 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.

15 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  
20 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 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*,  
25 *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),  
30 pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) and derivatives thereof, including strain 33D3 having genotype W3110  $\Delta$ fhuA ( $\Delta$ tonA) ptr3 lac Iq lacL8  $\Delta$ ompT( $\Delta$ nmpe-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*  $\lambda$  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

- 5 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.

10 ii. Antibody Production

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  
15 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  
20 electroporation.

- Prokaryotic cells used to produce the polypeptides 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 embodiments, the media also contains a selection agent, chosen based on the construction of the expression vector, to  
25 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 mixture  
30 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, 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.

If an inducible promoter is used in the expression vector, 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 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 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 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 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 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 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, 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 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 (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Aric 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, 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 transformed with plasmids overexpressing one or more chaperone proteins are used as host cells in the expression system.

### 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 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 purification of the full length antibody products. Protein A is a 41kD cell wall protein from *Staphylococcus aureus* 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  
5 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, 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  
10 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:

15 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  
20 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.

25 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  
30 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  
5 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  
10 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.,  
15 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  
20 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  
25 sequences are known for eukaryotes. Virtually all eukaryotic 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: 3). At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the signal for addition of  
30 the poly A tail to the 3' end of the coding sequence (SEQ ID NO: 4). 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,



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.

- 5       The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an 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  
10       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 higher eukaryotes is often increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Many  
15       enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin,  $\alpha$ -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 enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. See also Yaniv, Nature  
20       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.

(vi) Transcription termination component

- Expression vectors used in eukaryotic host cells will typically also contain  
25       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 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  
30       polyadenylation region. See WO94/11026 and the expression vector disclosed therein.

(vii) Selection and transformation of host cells

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

CD

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 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 (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 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.

(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, 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 factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCIN™ 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 concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such

a1

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, 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 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.

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 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 faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a CH3 domain, the Bakerbond ABX<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> chromatography 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

chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (e.g., from about 0-0.25M salt).

### Immunoconjugates

The invention contemplates immunoconjugates (interchangeably termed "antibody-  
5 drug conjugates" or "ADC"), comprising a anti-DLL4 antibodies 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  
10 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  
15 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  
20 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-  
25 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  
30 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

u7

CD20 antigen found on the surface of normal and malignant B lymphocytes and  $^{111}\text{In}$  or  $^{90}\text{Y}$  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).

- 5 Although ZEVALIN has activity against B-cell non-Hodgkin's Lymphoma (NHL), administration results in severe and prolonged cytopenias in most patients. MYLOTARG<sup>TM</sup> (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).

- 10 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
- 15 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,
- 25 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
- 30 radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , and  $^{186}\text{Re}$ . 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

ay

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

10 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

15 In some embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody (full length or fragments) 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. 20 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.

25 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.

30 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

95

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  
5 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 cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested in vitro on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses  $3 \times 10^5$  HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug,  
10 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  
15 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  
20 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.

25 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  
30 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.

alp

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),  
5 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-  
10 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  
15 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

20 In some embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody 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  
25 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  
30 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



91

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., 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 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,  $\gamma$ II,  $\alpha$ 2I,  $\alpha$ 3I, N-acetyl- $\gamma$ II, PSAG and  $\theta$ II (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 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, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tricothecenes. See, for example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

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  $\text{At}^{211}$ ,  $\text{I}^{131}$ ,  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{Y}^{90}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$ ,  $\text{Sm}^{153}$ ,  $\text{Bi}^{212}$ ,  $\text{P}^{32}$ ,  $\text{Pb}^{212}$  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  $\text{I}^{123}$ , 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  $\text{I}^{123}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$  and  $\text{In}^{111}$  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.

5 The compounds 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,  
10 Inc., Rockford, IL., U.S.A). See pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparation of antibody drug conjugates

In the antibody drug conjugates (ADC), 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  
15 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  
20 covalent bond, followed by reaction with the nucleophilic group of an antibody. Additional methods for preparing ADC are described herein.



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  
25 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.

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 (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 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

Vol

N-terminal serine or threonine residues can react with sodium meta-periodate, resulting in production of an aldehyde in place of the first amino acid (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Such aldehyde can be reacted with a drug moiety or linker nucleophile.

5 Likewise, nucleophilic groups on a drug moiety include, but are not limited to: amine, thiol, hydroxyl, hydrazide, oxime, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine 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  
10 such as haloacetamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups.

Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be 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  
15 desired properties of the conjugate.

In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as 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  
20 is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

#### **Covalent Modifications to DLL4 polypeptides**

Covalent modifications of polypeptide antagonists or agonists (e.g., a polypeptide antagonist fragment, a DLL4 fusion molecule (e.g., a DLL4 immunoadhesin), an anti-DLL4 antibody), are included within the scope of this invention. They may be made by chemical  
25 synthesis or by enzymatic or chemical cleavage of the polypeptide, if applicable. Other types of covalent modifications of the polypeptide are introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues, or by incorporating a modified amino acid or unnatural amino acid into the growing polypeptide  
30 chain, e.g., Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991); Noren et al. *Science* 244:182 (1989); and, & US Patent application publications 20030108885 and 20030082575.

Cysteinyll residues most commonly are reacted with  $\alpha$ -haloacetates (and corresponding amines), such as chloroacetic acid or chloroacetamide, to give carboxymethyl or carboxyamidomethyl derivatives. Cysteinyll residues also are derivatized

102  
by reaction with bromotrifluoroacetone,  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidozoyl)propionic acid, chloroacetyl phosphate, N-alkylmaleimides, 3-nitro-2-pyridyl disulfide, methyl 2-pyridyl disulfide, p-chloromercuribenzoate, 2-chloromercuri-4-nitrophenol, or chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

5 Histidyl residues are derivatized by reaction with diethylpyrocarbonate at pH 5.5-7.0 because this agent is relatively specific for the histidyl side chain. Para-bromophenacyl bromide also is useful; the reaction is typically performed in 0.1 M sodium cacodylate at pH 6.0.

10 Lysinyl and amino-terminal residues are reacted with succinic or other carboxylic acid anhydrides. Derivatization with these agents has the effect of reversing the charge of the lysinyl residues. Other suitable reagents for derivatizing  $\alpha$ -amino-containing residues include imidoesters such as methyl picolinimate, pyridoxal phosphate, pyridoxal, chloroborohydride, trinitrobenzenesulfonic acid, O-methylisourea, 2,4-pentanedione, and transaminase-catalyzed reaction with glyoxylate.

15 Arginyl residues are modified by reaction with one or several conventional reagents, among them phenylglyoxal, 2,3-butanedione, 1,2-cyclohexanedione, and ninhydrin. Derivatization of arginine residues requires that the reaction be performed in alkaline conditions because of the high  $pK_a$  of the guanidine functional group. Furthermore, these reagents may react with the groups of lysine as well as the arginine epsilon-amino group.

20 The specific modification of tyrosyl residues may be made, with particular interest in introducing spectral labels into tyrosyl residues by reaction with aromatic diazonium compounds or tetranitromethane. Most commonly, N-acetylimidazole and tetranitromethane are used to form O-acetyl tyrosyl species and 3-nitro derivatives, respectively. Tyrosyl residues are iodinated using  $^{125}\text{I}$  or  $^{131}\text{I}$  to prepare labeled proteins for  
25 use in radioimmunoassay.

Carboxyl side groups (aspartyl or glutamyl) are selectively modified by reaction with carbodiimides ( $\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$ ), where R and R' are different alkyl groups, such as 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide or 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl) carbodiimide. Furthermore, aspartyl and glutamyl residues are converted  
30 to asparaginyl and glutaminyl residues by reaction with ammonium ions.

Glutaminyl and asparaginyl residues are frequently deamidated to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively. These residues are deamidated under neutral or basic conditions. The deamidated form of these residues falls within the scope of this invention.

153

Other modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the  $\alpha$ -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification involves chemically or enzymatically coupling glycosides to a polypeptide of the invention. These procedures are advantageous in that they do not require production of the polypeptide in a host cell that has glycosylation capabilities for N- or O-linked glycosylation. Depending on the coupling mode used, the sugar(s) may be attached to (a) arginine and histidine, (b) free carboxyl groups, (c) free sulfhydryl groups such as those of cysteine, (d) free hydroxyl groups such as those of serine, threonine, or hydroxyproline, (e) aromatic residues such as those of phenylalanine, tyrosine, or tryptophan, or (f) the amide group of glutamine. These methods are described in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Removal of any carbohydrate moieties present on a polypeptide of the invention may be accomplished chemically or enzymatically. Chemical deglycosylation requires exposure of the polypeptide to the compound trifluoromethanesulfonic acid, or an equivalent compound. This treatment results in the cleavage of most or all sugars except the linking sugar (N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine), while leaving the polypeptide intact. Chemical deglycosylation is described by Hakimuddin, *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 (1987) and by Edge *et al. Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties, e.g., on antibodies, can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al. Meth. Enzymol.* 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of a polypeptide of the invention comprises linking the polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

### 30 **Pharmaceutical Formulations**

Therapeutic formulations comprising an antibody 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.

10/1

Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to 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; 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; 10 monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as 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).

15 The formulation herein may also contain more than one active compound as 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 20 example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, 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 25 Pharmacy 20th edition (2000).

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 30 containing the immunoglobulin, which matrices are in the form of shaped 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  $\gamma$  ethyl-L-



105

glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), 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, 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 sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

It is further contemplated that an agent useful in the invention can be introduced to a subject by gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration of a nucleic acid to a subject. In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve in vivo synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA. Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes in vivo. See, e.g., DLL4-SiRNA described in the Examples. It has already been shown that short antisense oligonucleotides can be imported into cells where they act as inhibitors, despite their low intracellular concentrations caused by their restricted uptake by the cell membrane. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986)). The oligonucleotides can be modified to enhance their uptake, e.g. by substituting their negatively charged phosphodiester groups by uncharged groups. For general reviews of the methods of gene therapy, see, for example, Goldspiel et al. Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan and Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); and May TIBTECH 11:155-215 (1993). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al.

106

eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

*Dosage and Administration*

The molecules are administered to a human patient, in accord with known methods, such as intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes, and/or subcutaneous administration.

In certain embodiments, the treatment of the invention involves the combined administration of a DLL4 antagonist and one or more anti-cancer agents, e.g., anti-angiogenesis agents. In one embodiment, additional anti-cancer agents are present, e.g., one or more different anti-angiogenesis agents, one or more chemotherapeutic agents, etc. The invention also contemplates administration of multiple inhibitors, e.g., multiple antibodies to the same antigen or multiple antibodies to different cancer active molecules. In one embodiment, a cocktail of different chemotherapeutic agents is administered with the DLL4 antagonist and/or one or more anti-angiogenesis agents. The combined administration includes coadministration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and/or consecutive administration in either order. For example, a DLL4 antagonist may precede, follow, alternate with administration of the anti-cancer agents, or may be given simultaneously therewith. In one embodiment, there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of DLL4 antagonist will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the inhibitor is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the inhibitor, and the discretion of the attending physician. The inhibitor is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. In a combination therapy regimen, the compositions of the invention are administered in a therapeutically effective amount or a therapeutically synergistic amount. As used herein, a therapeutically effective amount is such that administration of a composition of the invention and/or co-administration of DLL4 antagonist and one or more other therapeutic agents, results in reduction or inhibition of the targeting disease or condition. The effect of the administration of a combination of agents can be additive. In one embodiment, the result of the administration is a synergistic effect. A therapeutically synergistic amount is that amount of DLL4 antagonist and one or

more other therapeutic agents, e.g., an angiogenesis inhibitor, necessary to synergistically or significantly reduce or eliminate conditions or symptoms associated with a particular disease.

Depending on the type and severity of the disease, about 1  $\mu\text{g/kg}$  to 50 mg/kg (e.g. 0.1-20mg/kg) of DLL4 antagonist or angiogenesis inhibitor is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1  $\mu\text{g/kg}$  to about 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. However, other dosage regimens may be useful. Typically, the clinician will administered a molecule(s) until a dosage(s) is reached that provides the required biological effect. The progress of the therapy of the invention is easily monitored by conventional techniques and assays.

For example, preparation and dosing schedules for angiogenesis inhibitors, e.g., anti-VEGF antibodies, such as AVASTIN® (Genentech), may be used according to manufacturers' instructions or determined empirically by the skilled practitioner. In another example, preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

#### *Efficacy of the Treatment*

The efficacy of the treatment of the invention can be measured by various endpoints commonly used in evaluating neoplastic or non-neoplastic disorders. For example, cancer treatments can be evaluated by, e.g., but not limited to, tumor regression, tumor weight or size shrinkage, time to progression, duration of survival, progression free survival, overall response rate, duration of response, and quality of life. Because the anti-angiogenic agents described herein target the tumor vasculature and not necessarily the neoplastic cells themselves, they represent a unique class of anticancer drugs, and therefore can require unique measures and definitions of clinical responses to drugs. For example, tumor shrinkage of greater than 50% in a 2-dimensional analysis is the standard cut-off for declaring a response. However, the inhibitors may cause inhibition of metastatic spread without shrinkage of the primary tumor, or may simply exert a tumouristatic effect. Accordingly, approaches to determining efficacy of the therapy can be employed, including

for example, measurement of plasma or urinary markers of angiogenesis and measurement of response through radiological imaging.

The following Examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

5 The disclosures of all patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

### EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the Examples were used according to  
10 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.

#### 15 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  
20 200 HUVEC-coated beads were imbedded in fibrin clot in one well of 12-well tissue culture plate.  $8 \times 10^4$  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  
25 (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-  
30 rabbit IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch). All overnight incubations were done at 4°C.

**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

159

primary cocktail included biotinylated isolectin B4 (25 µg/ml, Bandeiraca simplicifolia; 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 CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MnCl<sub>2</sub>, in PBS pH6.8). Retinas were then washed in PBST, and incubated overnight with secondary antibody combination of Alexa 488 streptavidin (1:200; Molecular 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.

10        **Tumor models.** Beige nude female mice of 8- to 10-week-old were used. To obtain subcutaneous tumors, mice were injected with 0.1 ml cell suspension containing 50% matrigel (BD Bioscience) into the right posterior flank. 5X10<sup>6</sup> human colon cancer HM7 cells, 10X10<sup>6</sup> human colon carcinoma Colo205 cells, 10X10<sup>6</sup> human lung carcinoma Calu6 cells, 10X10<sup>6</sup> human lung carcinoma MV-522 cells, 10X10<sup>6</sup> mouse leukemia WEHI-3 cells, 15    10X10<sup>6</sup> mouse lymphoma EL4 cells, 10X10<sup>6</sup> human ovarian cancer SK-OV-3 X1 cells, 10X10<sup>6</sup> mouse lung cancer LL2 cells, 10X10<sup>6</sup> leukemia/lymphoma EL4 cells, or 10X10<sup>6</sup> 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 (5X10<sup>6</sup>) suspension containing 50% matrigel. Anti-DLL4 antibody YW26.82 was 20    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 mm<sup>3</sup>) 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 (mm<sup>3</sup>) was determined by measuring the length (l) 25    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.

30        **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

110

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.

5 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  
10 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  
15 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:

CAACTGCCCTTATGGCTTTTT (SEQ ID NO: 5) (Oligo 1, sense),  
AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT (SEQ ID NO: 6) (Oligo 1, antisense),  
20 CAACTGCCCTTCAATTTTCATT (SEQ ID NO: 7) (Oligo 2, sense),  
TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT (SEQ ID NO: 8) (Oligo 2, antisense),  
TGACCAAGATCTCAACTACTT (SEQ ID NO: 9) (Oligo 3, scense),  
GTAGTTGAGATCTTGGTCATT (SEQ ID NO: 10) (Oligo 3, antisense),  
GGCCAACTATGCTTGTGAATT (SEQ ID NO: 11) (Oligo 4, sense),  
25 TTCACAAGCATAGTTGGCCTT (SEQ ID NO: 12) (Oligo 4, antisense).

**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  
30 transiently transfected with plasmid expressing DLL4-AP with Fugen6 reagent (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

221

antibody/DLL4-AP mixture was then added to rrNotch1-Fc coated plate for 1hr at room 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 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 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 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 (±SEM) fold mRNA changes relative to control from 3 separate determinations. The forward and reverse primer and probe sequences for VEGFR2, TGFβ2 and GAPDH were as follows.

TGFb2  
Forward: GTA AAG TCT TGC AAA TCC AGC TA (SEQ ID NO: 13)  
Reverse: CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (SEQ ID NO: 14)  
Probe: AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (SEQ ID NO: 15)  
VEGFR2  
Forward: CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (SEQ ID NO: 16)  
Reverse: TGC AGT CCG AGG TCC TTT (SEQ ID NO: 17)  
Probe: CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (SEQ ID NO: 18)  
GAPDH  
Forward: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (SEQ ID NO: 19)

Reverse: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (SEQ ID NO: 20)

Probe: CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (SEQ ID NO: 21)

### 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 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 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 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 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 5a 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



113

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 YW26.82 recognized an epitope in the EGL2 domain of the human DLL4 ECD.

5 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  
10 used as assay control (Figure 5b). The results of this experiment are shown in Figure 5b. 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,  
15 Jag1 or DLL1 also demonstrated that Mab YW26.82 selectively bound to DLL4. As shown in Figure 5c, 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),  
20 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 5d, anti-DLL4 Mab blocked the binding of DLL4-AP, but not DLL1-AP,  
25 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  
30 with control or DLL4-specific siRNA was performed. 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 5e. 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

114

demonstrated that anti-DLL4 Mab YW26.82 specifically binds to endogenously expressed DLL4 in HUVEC.

**Example 4: Treatment with anti-DLL4 antibody increased endothelial cell proliferation in vitro**

5 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. 1a). Proteolytic processing of Notch, catalyzed by the  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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. 1b). 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. 1c). These findings suggest that the activation status of DLL4/Notch signaling is closely associated with EC proliferation.

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

25 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. 1d). A significant increase of Ki67 labeling in ECs was observed,

indicating elevated EC proliferation (Fig. 1h). Therefore, this hyperproliferative phenotype of retinal ECs upon DLL4 blockade in neonatal mice corroborated the in vitro findings.

**Example 6: Essential role of DLL4/Notch in regulating epithelial cell proliferation**

5 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 6), 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  $\mu$ M). 36 hr after stimulation, endogenous DLL4 expression was examined by FACS analysis with anti-DLL4 antibody.

20 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. 1f), 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. 1g). Conversely, activation of Notch by immobilized DLL4 suppressed the expression of VEGFR2 (Fig. 1g). 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 7: 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. 2a), suggesting defective EC differentiation. In the Mab YW26.82-treated retinas, the characteristic pattern of radially alternating arteries and veins

116

was severely disrupted. Anti- $\alpha$  smooth muscle actin (ASMA) staining, which is associated with the retinal arteries, was completely absent (Fig. 2c). This observation was remarkably similar to the defective arterial development in DLL4<sup>+/-</sup> embryos. These findings, from different angles, highlighted the essential role of DLL4/Notch in regulating EC

5 differentiation.

**Example 8: TGF $\beta$  expression was linked to activation status of Notch**

Similar to Notch pathway, TGF $\beta$  signaling is context dependent and has diverse and often opposing effects on cell differentiation, proliferation and growth inhibition. Moreover, the TGF $\beta$  pathway has been implicated in vascular processes (Urness, L. D. et al, Nat Genet 10 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 $\beta$  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 15 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 $\beta$ 2 (Fig. 2b) was tightly linked to the activation status of Notch, suggesting that TGF $\beta$  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 20 regulating DLL4 expression and engages TGF $\beta$  pathway to promote EC differentiation.

**Example 9: 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 25 tumor models (Figs. 3a-d). In HM7, Colo205 and Calu6 xenograft tumor models (Figs. 3a-c), YW26.82 treatment was initiated after tumor establishment ( $\geq 250$  mm<sup>3</sup> 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 30 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.3d).

117

We also investigated the impact of blocking DLL4 and/or VEGF on numerous tumor growth in preclinical tumor models (Figs. 3e-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 10: Treatment with anti-DLL4 antibody increased tumor endothelial cell proliferation**

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.3g). In contrast, anti-VEGF had a completely opposite effect (Fig.3g), although both treatments exhibited similar efficacy in this model.

**Example 11: 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. 2a), 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. 3h). 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.

**Example 12: DLL4/Notch is dispensable 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); Frc, S. et al. Nature 435, 964-8 (2005)). Indeed,  $\gamma$ -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 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.4). 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.4). These results support the notion that DLL4/Notch signaling is largely restricted to the vascular system.

**Example 13: 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. 2d). 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.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. However, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will be apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

119

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for treating a tumor, cancer, or cell proliferative disorder comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment, whereby the tumor, cancer or cell proliferative disorder is treated.
2. The method of claim 1, wherein the tumor, cancer or cell proliferative disorder is colon cancer, lung cancer, melanoma or lymphoma.
3. A method for treating a pathological condition associated with angiogenesis comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to a subject in need of such treatment, whereby the pathological condition associated with angiogenesis is treated, wherein the DLL4 antagonist is capable of stimulating endothelial cell proliferation, inhibiting endothelial cell differentiation, inhibiting arterial development, or inhibiting vascular perfusion.
4. The method of claim 3, wherein the pathological condition associated with angiogenesis is a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder.
5. The method of claim 3, wherein the pathological condition associated with angiogenesis is an intraocular neovascular disease.
6. A method for stimulating endothelial cell proliferation in a subject in need of such treatment comprising administering an effective amount of a DLL4 agonist to the subject, whereby endothelial cell proliferation is stimulated.
7. A method for reducing or inhibiting endothelial cell differentiation in a subject in need of such treatment comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to the subject, whereby endothelial cell differentiation is inhibited.
8. A method of reducing or inhibiting arterial development in a subject in need of such treatment comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to the subject, whereby arterial development is inhibited.

122

9. A method of reducing or inhibiting tumor vascular perfusion in a subject in need of such treatment comprising administering an effective amount of a DLL4 antagonist to the subject, whereby tumor vascular perfusion is inhibited.

5           10. The method of any of claims 1-9, further comprising administering to the subject an effective amount of an anti-angiogenic agent.

          11. The method of claim 10, wherein the anti-angiogenic agent is administered prior to or subsequent to the administration of the DLL4 antagonist.

10

          12. The method of claim 10, wherein the anti-angiogenic agent is administered concurrently with the DLL4 antagonist.

          13. The method of any of claims 10-12, wherein the anti-angiogenic agent is an  
15 antagonist of vascular endothelial cell growth factor (VEGF).

          14. The method of claim 13, wherein the VEGF antagonist is an anti-VEGF antibody.

20           15. The method of claim 14, wherein the anti-VEGF antibody is bevacizumab.

          16. The method of any of claims 1-15 further comprising administering an effective amount of a chemotherapeutic agent.

25           17. A method of enhancing efficacy of an anti-angiogenic agent in a subject having a pathological condition associated with angiogenesis, comprising administering to the subject an effective amount of a DLL4 antagonist in combination with the anti-angiogenic agent, thereby enhancing said anti-angiogenic agent's inhibitory activity.

30           18. The method of claim 17, wherein the pathological condition associated with angiogenesis is a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder.

          19. The method of claim 17, wherein the pathological condition associated with angiogenesis is an intraocular neovascular disease.



121

WO 2007/143689

PCT/US2007/070516

20. The method of any of claims 1-19 wherein the DLL4 antagonist is an anti-DLL4 antibody.
- 5        21. The method of any of claims 1-19 wherein the DLL4 antagonist is a DLL4 immunoadhesin.
22. The method of claim 20, wherein the DLL4 antibody is a monoclonal antibody.
- 10       23. The method of claim 20, wherein the DLL4 antibody is a human antibody, a humanized antibody, or a chimeric antibody.
24. The method of claim 20, wherein the DLL4 antibody is an antibody fragment.
- 15       25. The method of claim 24, wherein the antibody fragment is a Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, or scFv.

122

1 / 17

**FIG. 1a**

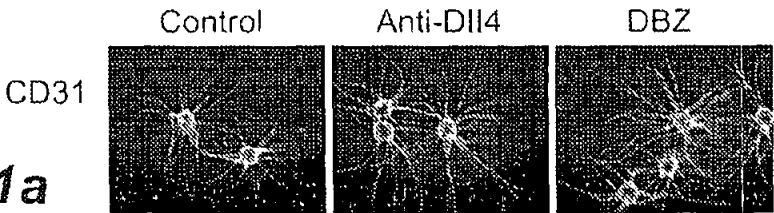


**FIG. 1b**

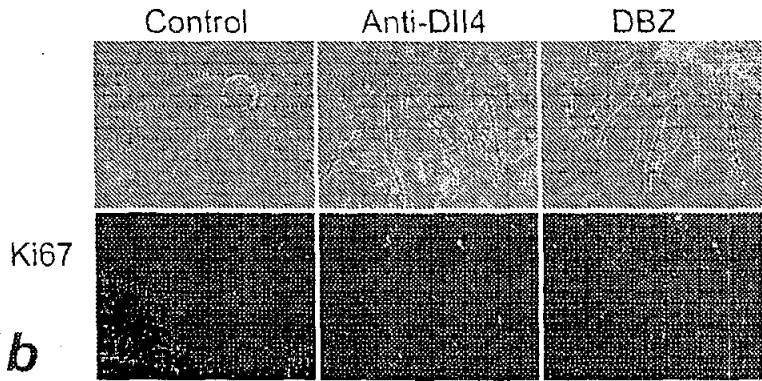


**FIG. 1c**

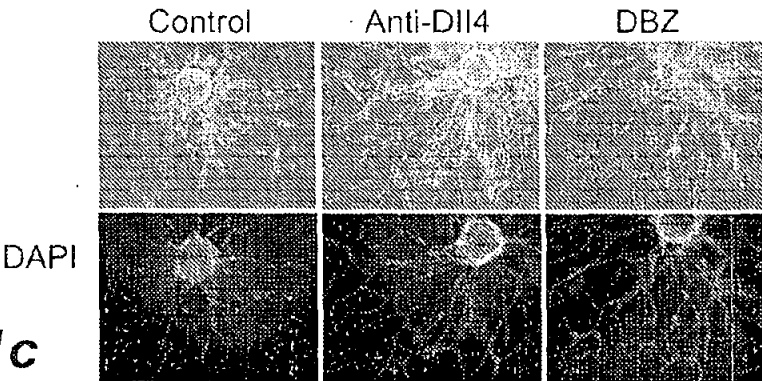
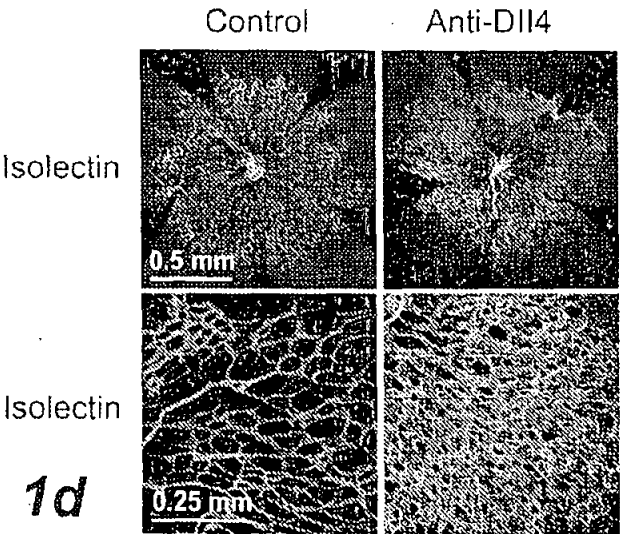


**FIG. 1d**



123

2 / 17

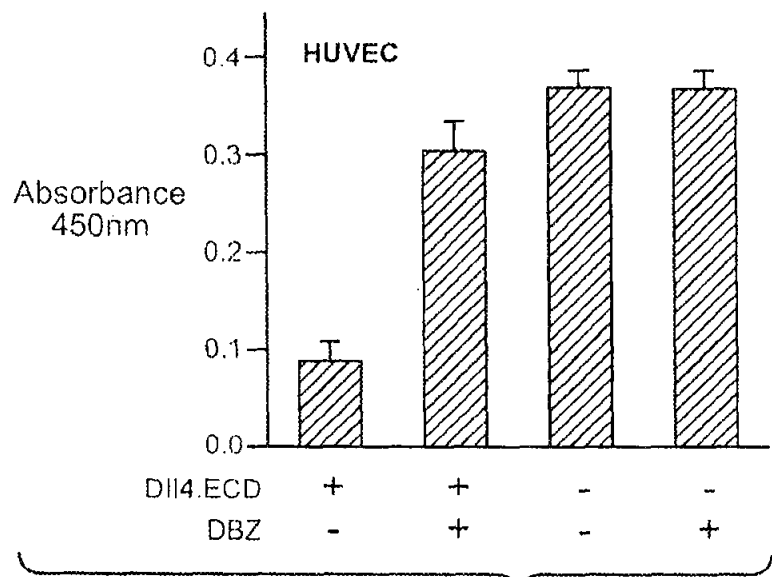


FIG. 1e

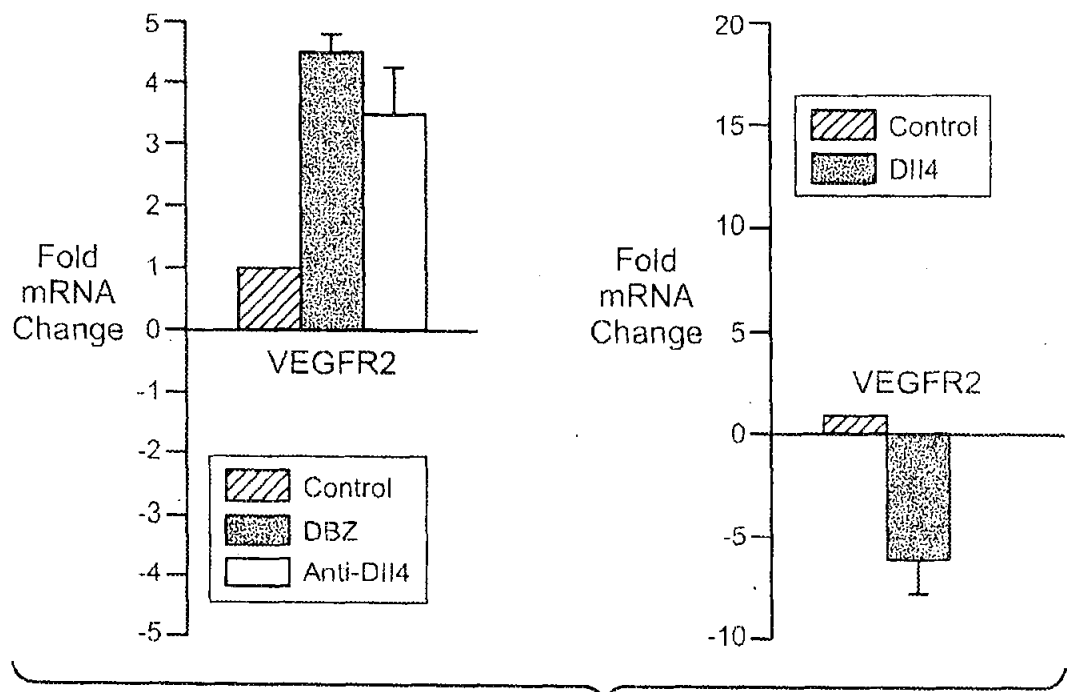


FIG. 1g

3 / 17

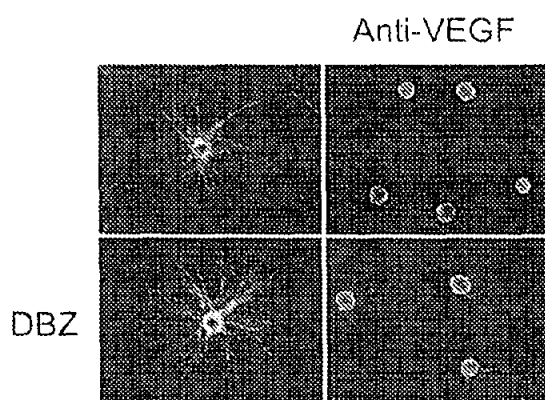


**FIG. 1f**

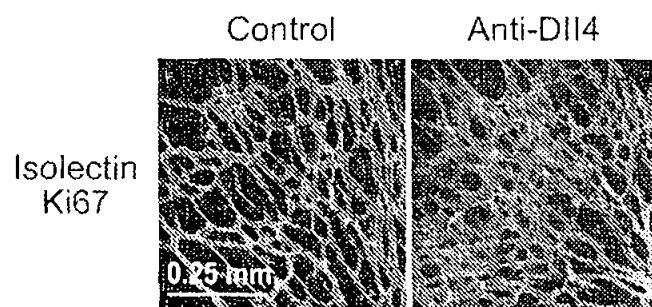


**FIG. 1h**

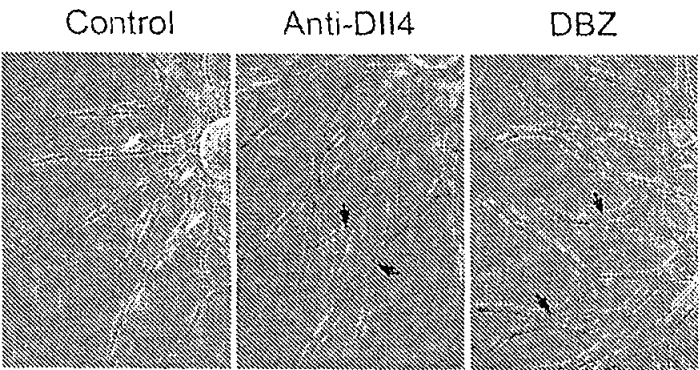


**FIG. 2a**

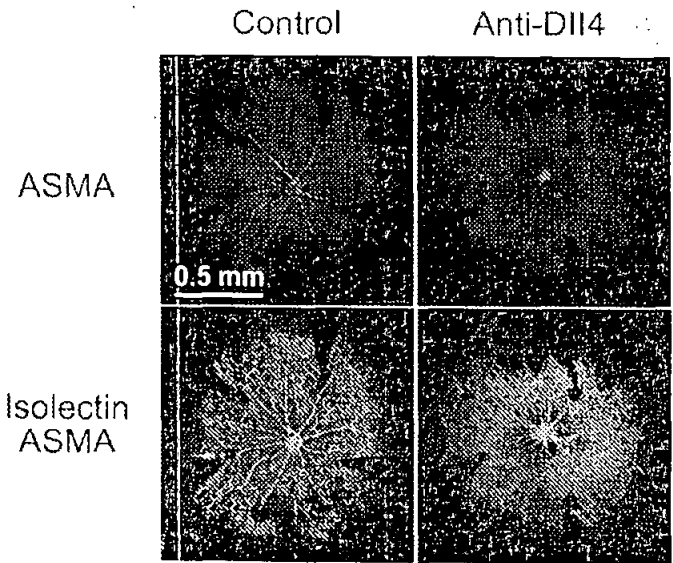


**FIG. 2c**

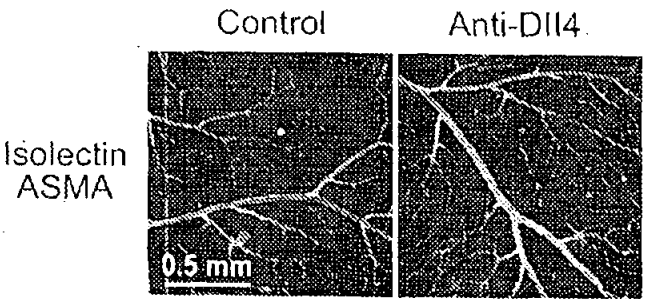


**FIG. 2d**

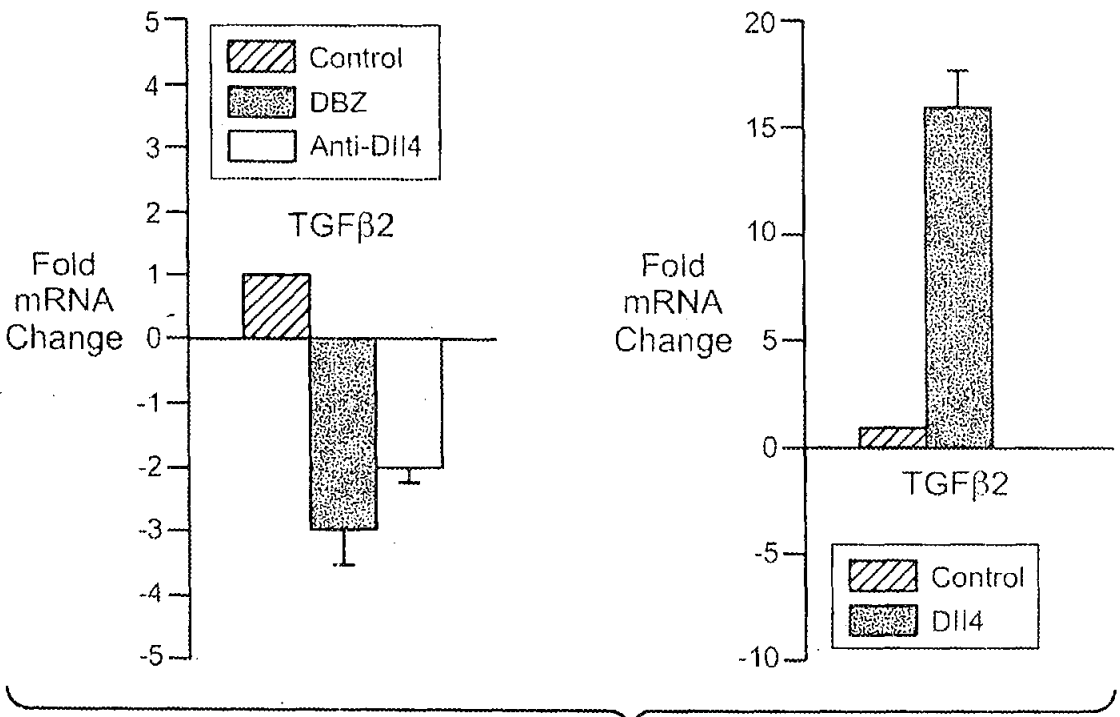
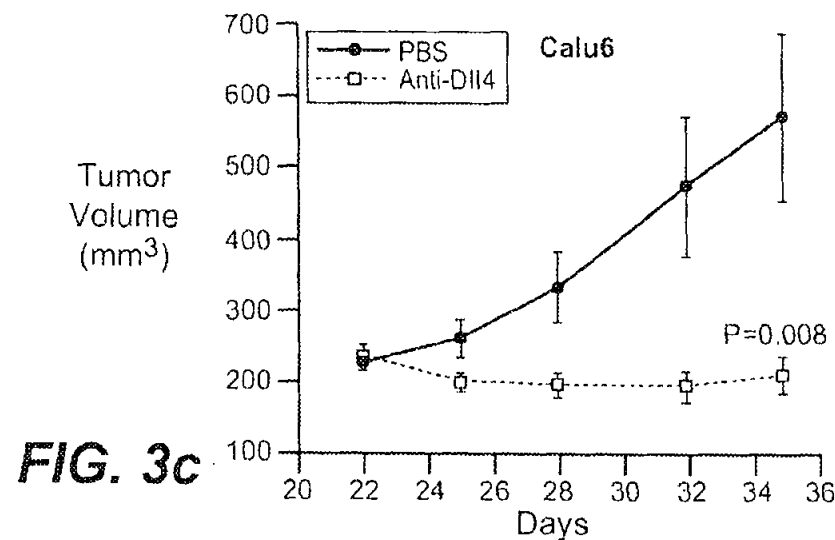
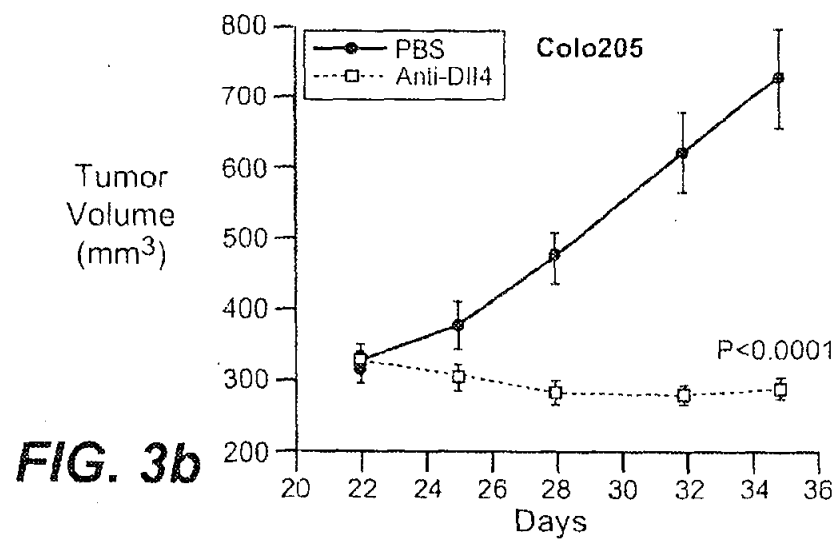
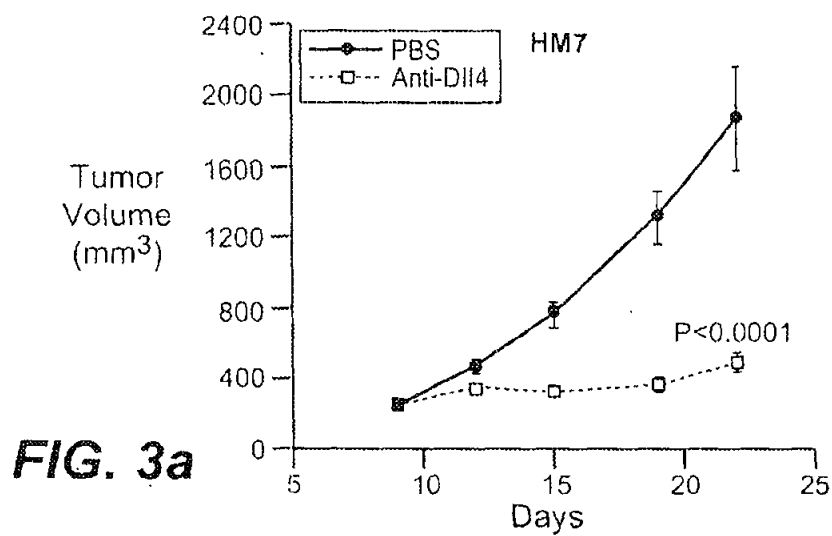
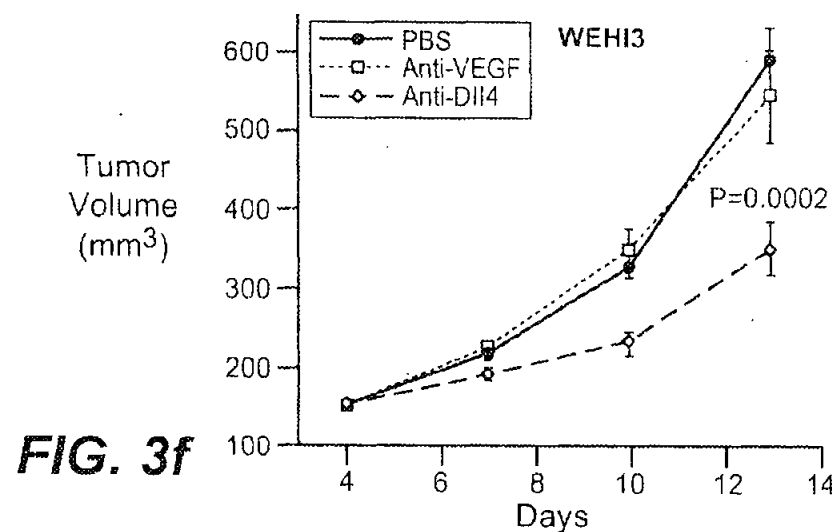
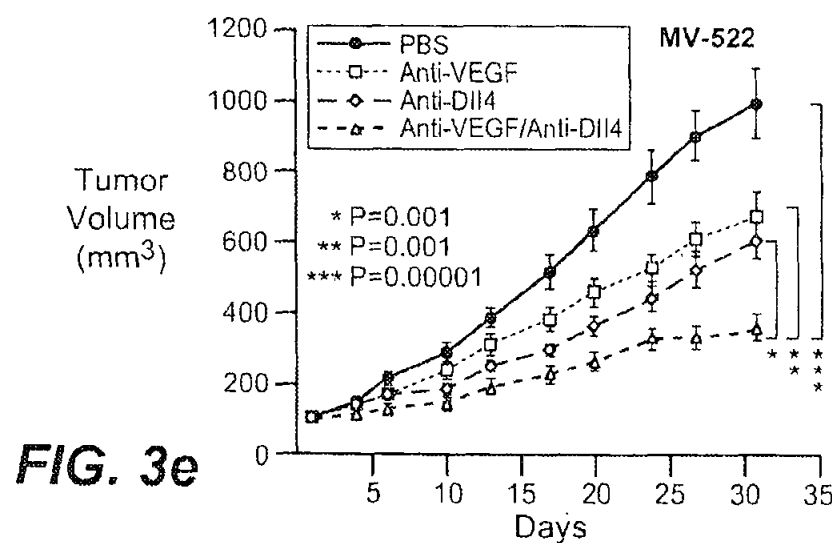
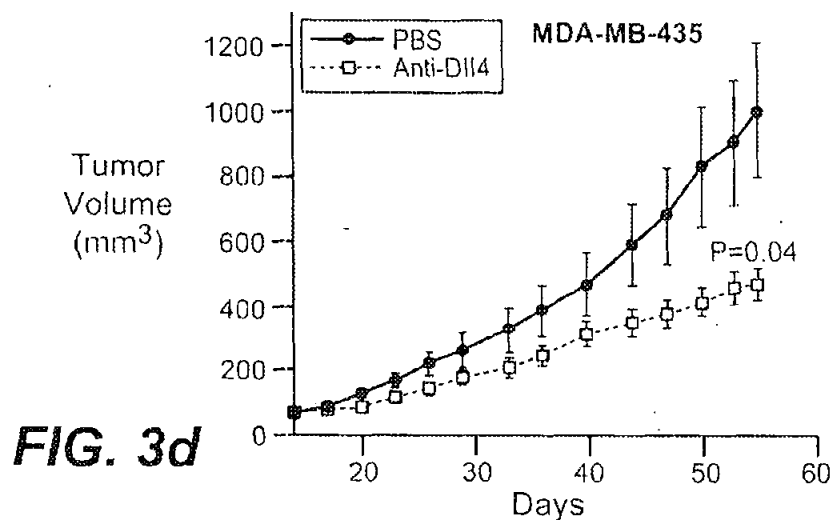


FIG. 2b

6 / 17



7 / 17





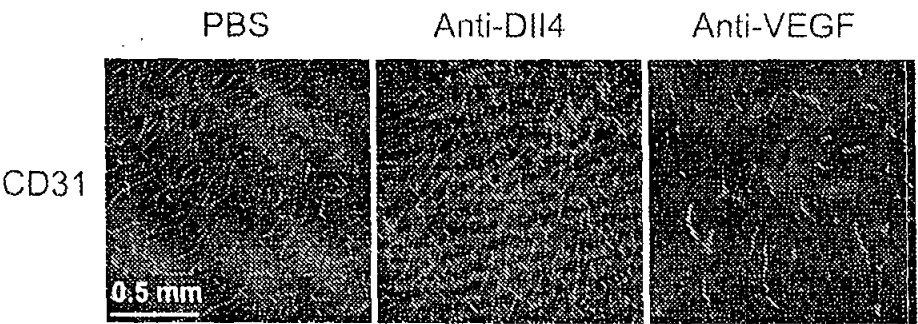


FIG. 3g

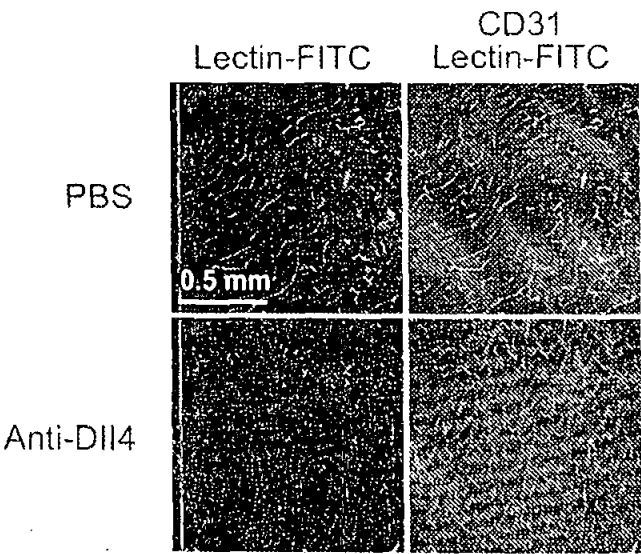
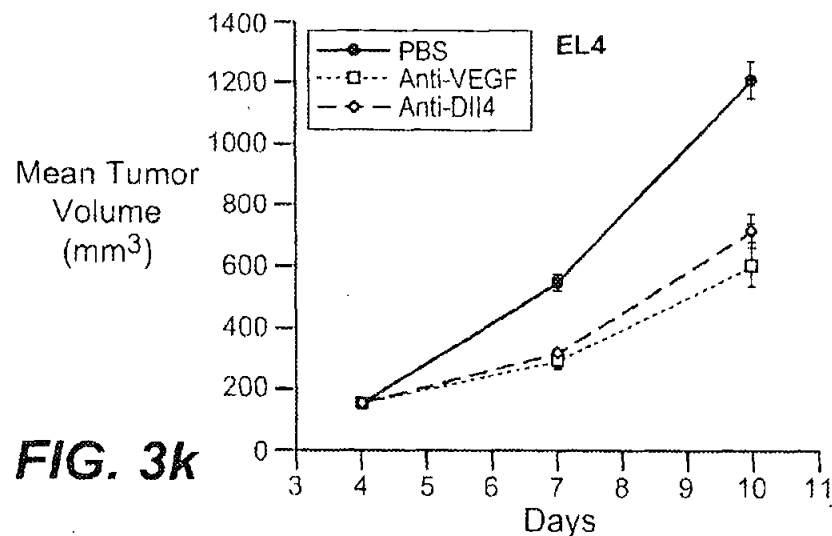
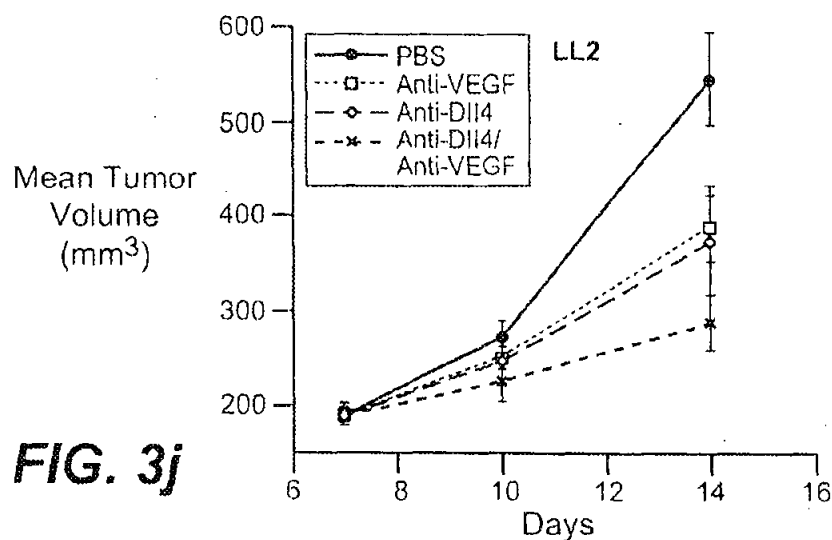
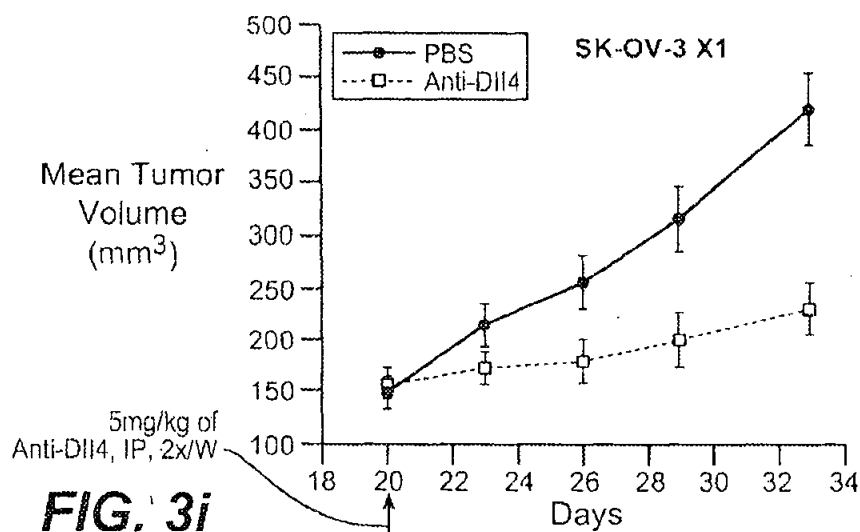


FIG. 3h

9 / 17



10 / 17

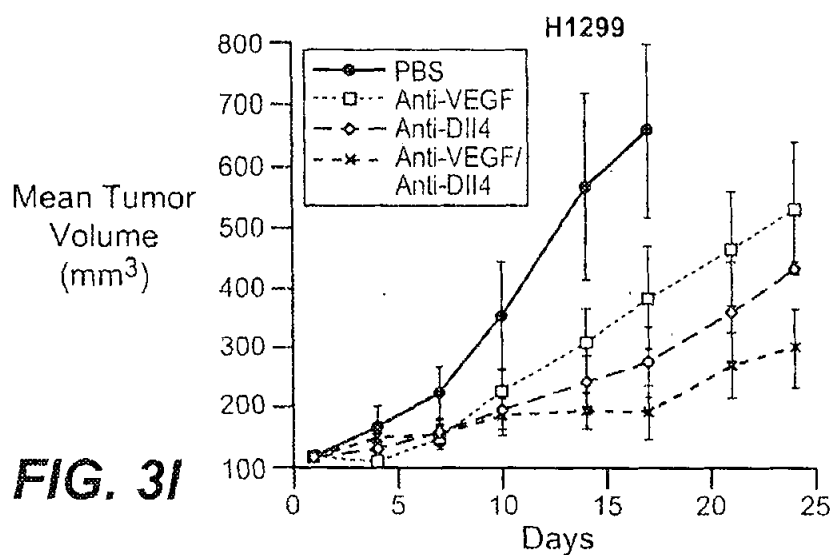


**FIG. 3l**

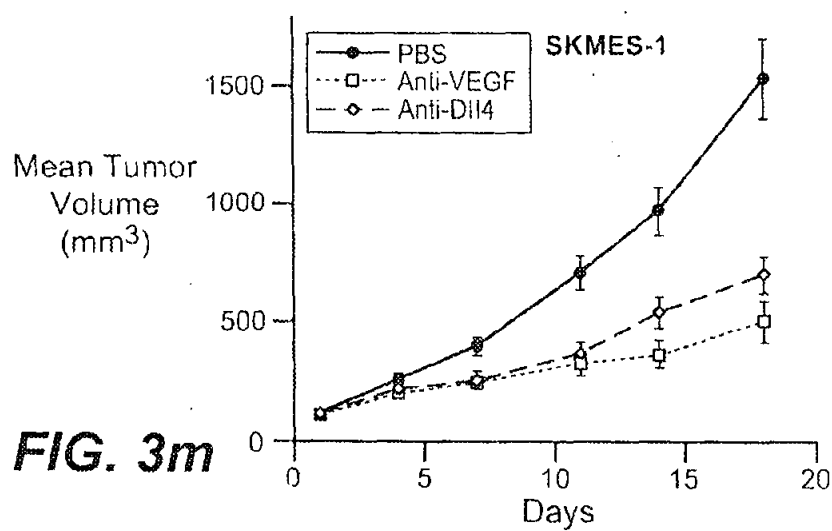


**FIG. 3m**

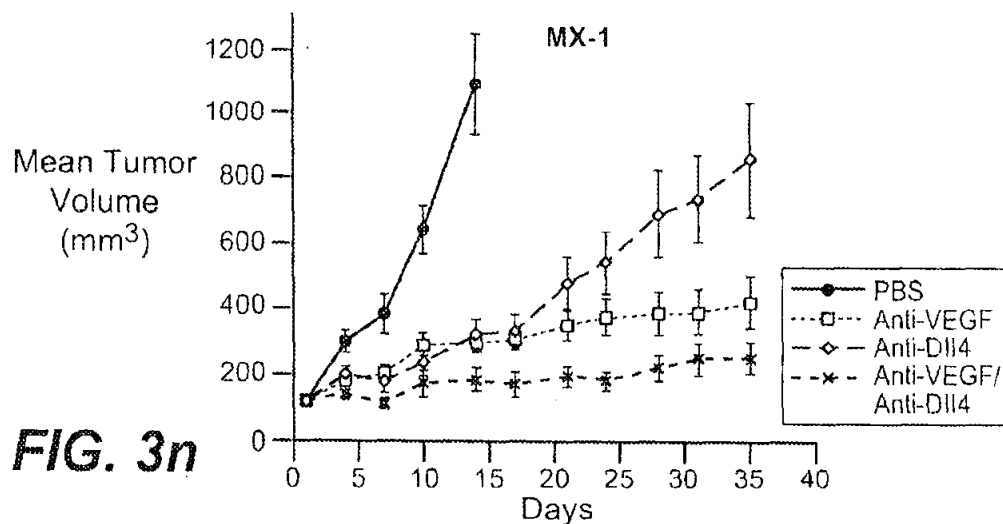


**FIG. 3n**

11 / 17

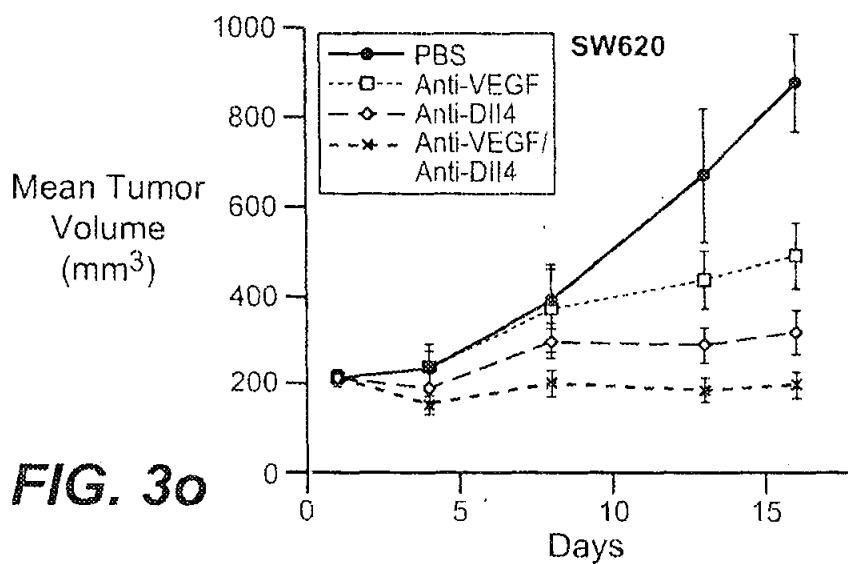


**FIG. 3o**

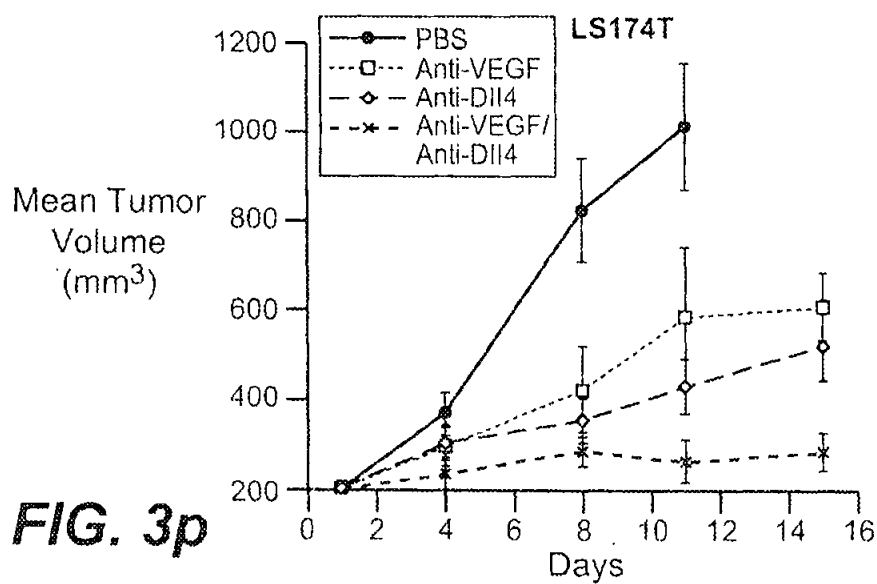


**FIG. 3p**

137

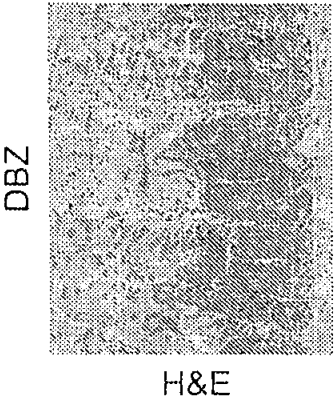


**FIG. 4c**

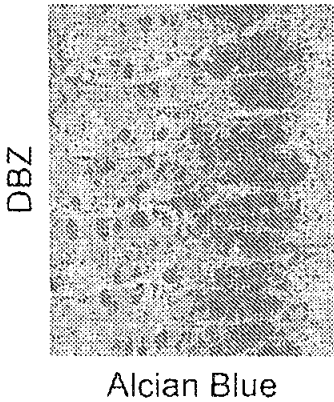


**FIG. 4f**

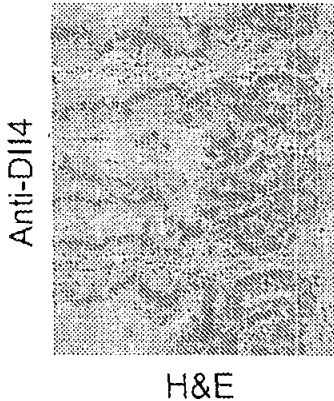


**FIG. 4b**

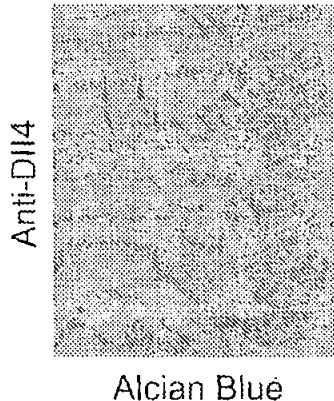


**FIG. 4e**

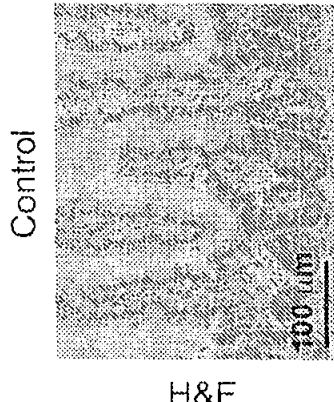


**FIG. 4a**

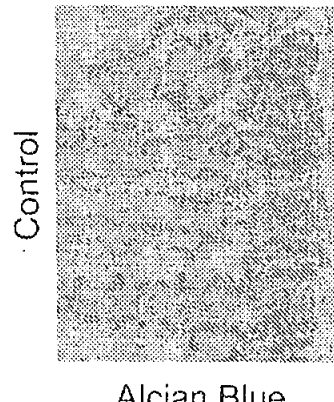


**FIG. 4d**

134

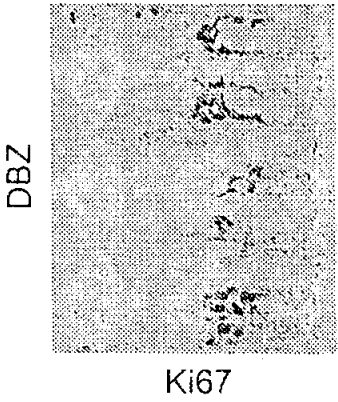


**FIG. 4i**

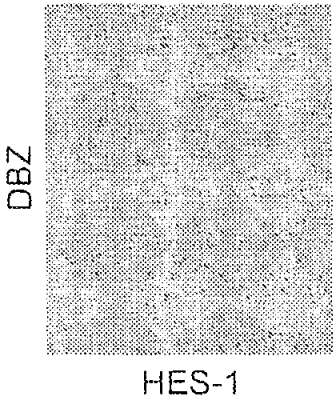


**FIG. 4i**

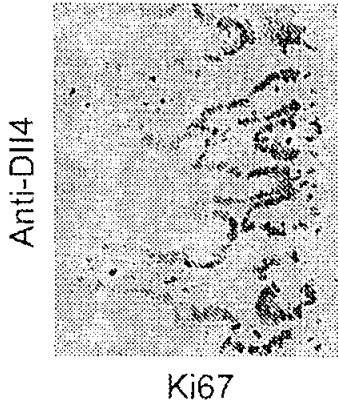


**FIG. 4h**

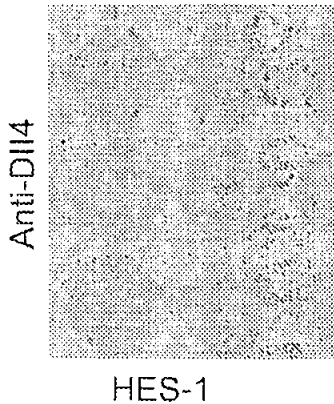


**FIG. 4k**

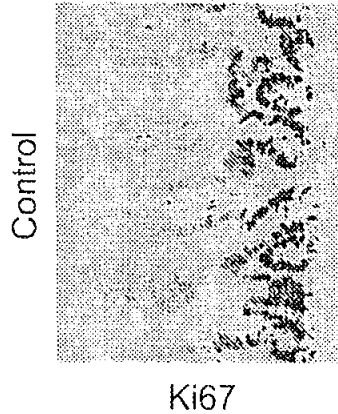


**FIG. 4g**

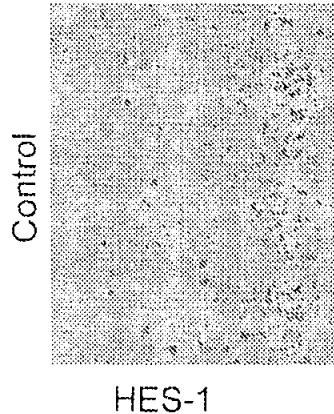


**FIG. 4j**

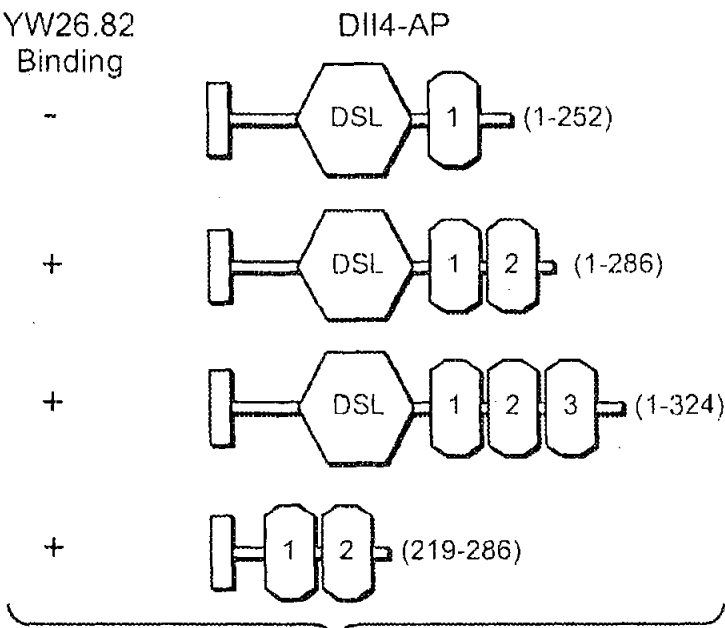


FIG. 5a

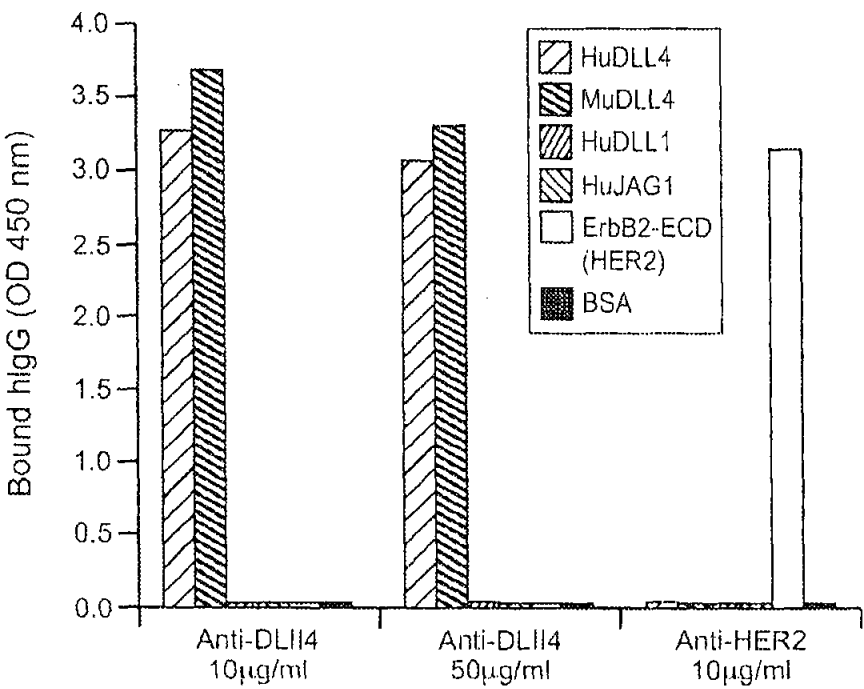


FIG. 5b

15 / 17

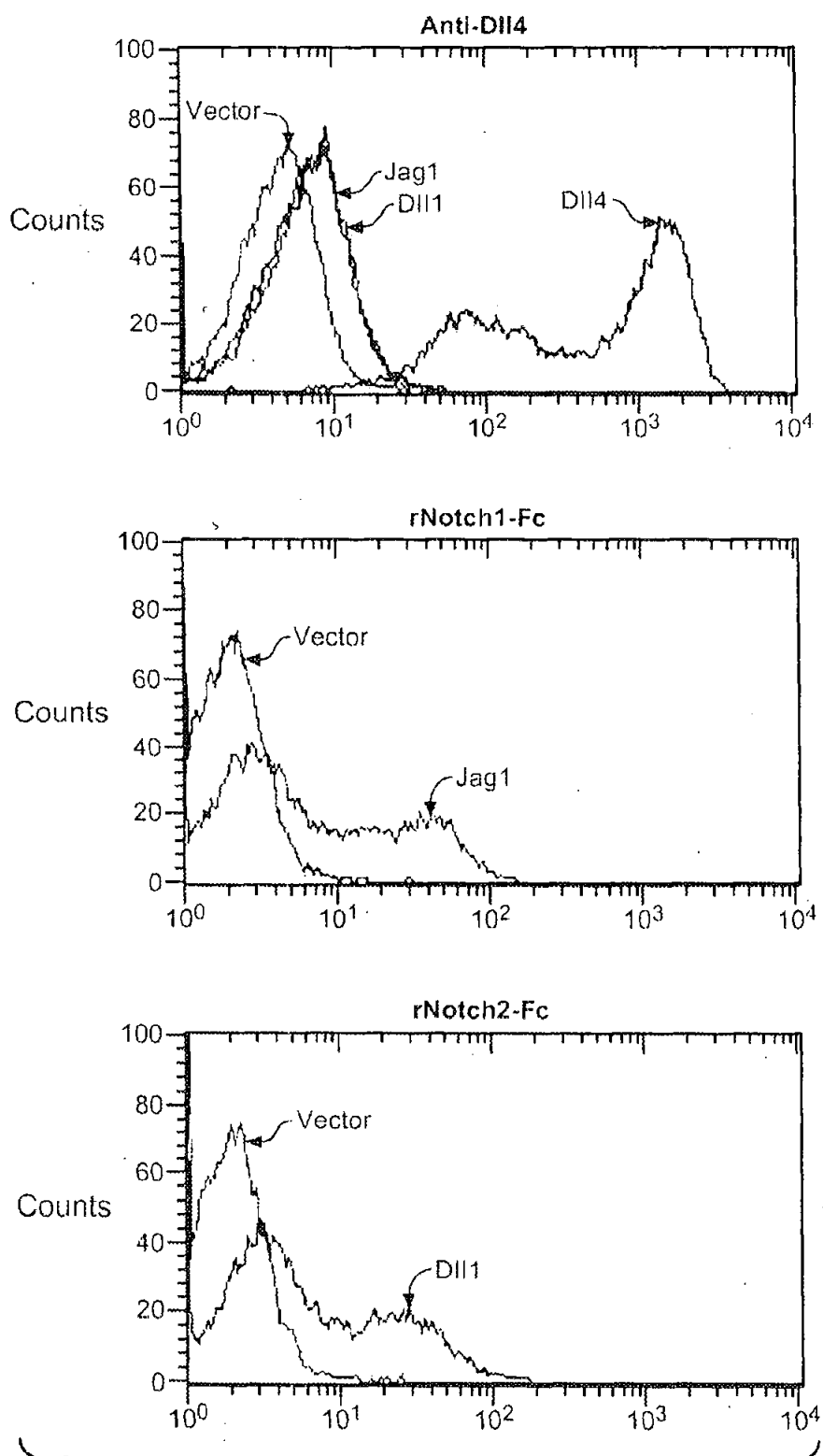


**FIG. 5c**



16 / 17

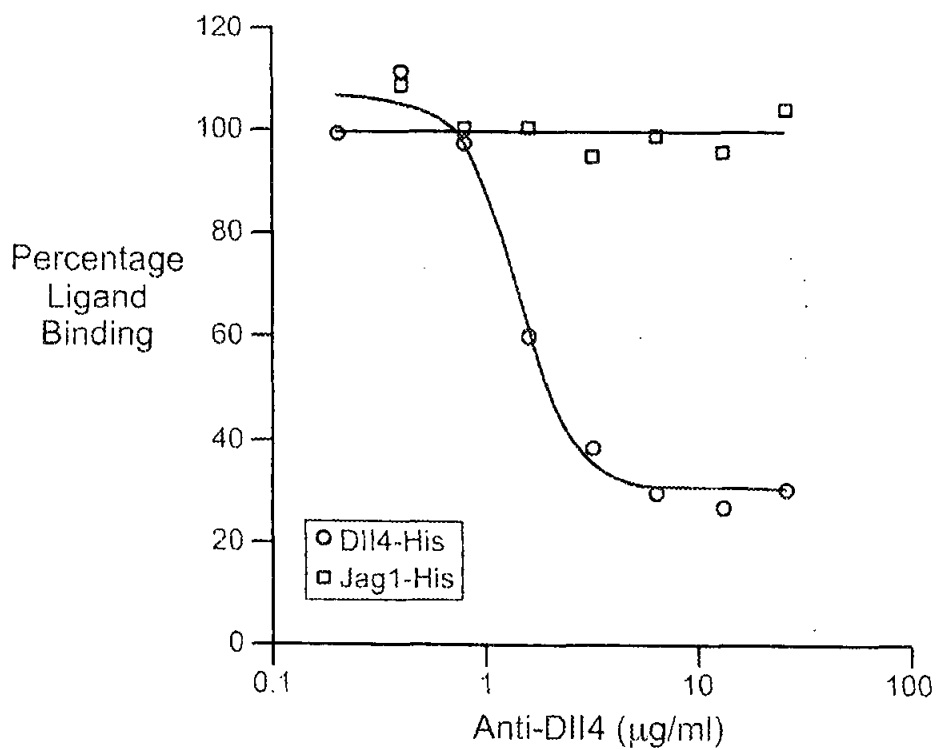
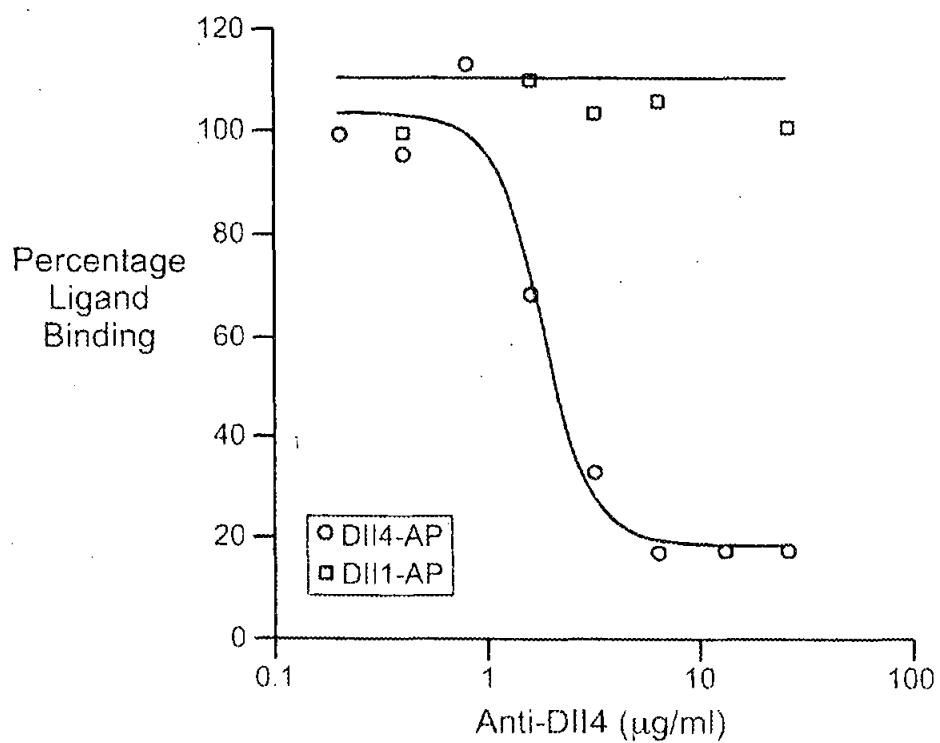


**FIG. 5d**

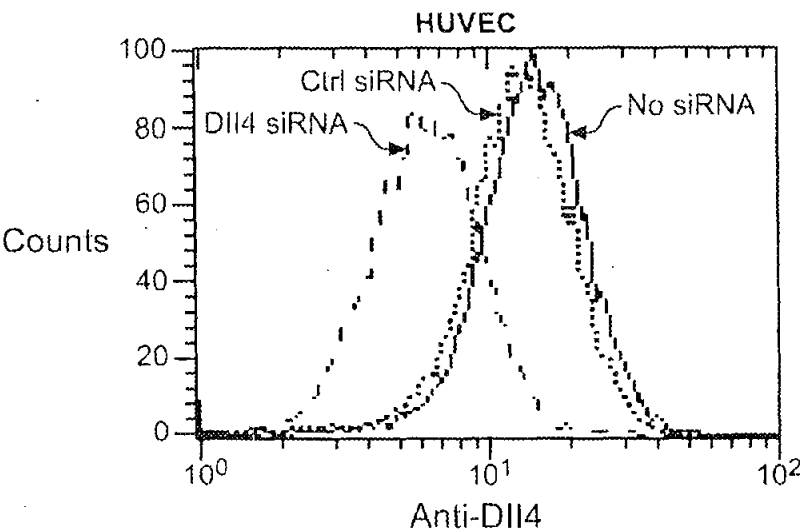


FIG. 5e

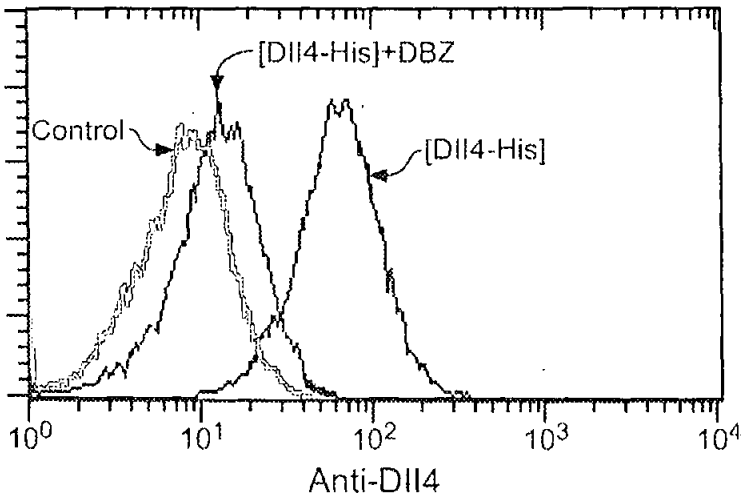


FIG. 6

139

<110> GENENTECH, INC.  
YAN, Minhong

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

<130> P2372R1

<150> US 60/811,357

<151> 2006-06-06

<150> US 60/866,767

<151> 2006-11-21

<160> 21

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 1

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 Thr  
110 115

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence

<400> 2

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

140

GENENLAW-#245846-v1-P2372R1\_SequenceListing

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 Thr Tyr Tyr Cys Gln  
80 85 90  
Gln Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
95 100 105  
Glu Ile Lys Arg

- <210> 3
- <211> 6
- <212> DNA
- <213> Artificial sequence
- <220>
- <223> sequence is synthesized
- <220>
- <221> CAAT\_signal modified\_base
- <222> 2
- <223> CAAT box
- <400> 3
- cncaat 6
- <210> 4
- <211> 6
- <212> DNA
- <213> Artificial sequence
- <220>
- <223> sequence is synthesized
- <220>
- <221> polyA\_signal
- <222> full
- <223> polyadenylation signal
- <400> 4
- aataaa 6
- <210> 5
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial sequence
- <220>
- <223> siRNA
- <400> 5
- caactgccct tatggctttt t 21

741

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> siRNA  
  
 <400> 6  
 aaagccataa gggcagttgt t 21  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> siRNA  
  
 <400> 7  
 caactgccct tcaatttcac t 21  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> siRNA  
  
 <400> 8  
 tgaaattgaa gggcagttgt t 21  
  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> siRNA  
  
 <400> 9  
 tgaccaagat ctcaactact t 21  
  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> siRNA  
  
 <400> 10  
 gtagttgaga tcttggtcat t 21  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> siRNA

14 ✓

<400> 11  
ggccaactat gcttgtgaat t 21

<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> siRNA

<400> 12  
ttcacaagca tagttggcct t 21

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 13  
aagtcttgca aatgcagcta 20

<210> 14  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 14  
catcatcatt atcatcatca ttgtc 25

<210> 15  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide probe

<400> 15  
aattcttgga aaagtggcaa gaccaaaat 29

<210> 16  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 16  
ctttcacca gcaggaagta g 21

<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

147

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 17  
tgcagtccga ggtccttt 18

<210> 18  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide probe

<400> 18  
cgcatttgat ttctatttcg acaacaga 28

<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 19  
gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 20  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 20  
gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide probe

<400> 21  
caagcttccc gttctcagcc 20

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

114

VERSIÓN CORREGIDA

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional

13 de diciembre de 2007 (13.12.2007)



PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2007/143689 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 16/28 (2006.01), A61K 47/48 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:

PCT/US2007/070516

(22) Fecha de Presentación Internacional:

6 de junio de 2007 (06.06.2007)

(25) Idioma de Presentación:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

60/811,357 6 de junio de 2006 (6.06.2006) EU  
60/866,767 21 de noviembre de 2006 (21.11.2006) EU

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).

(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).

(74) Agente: KALINOWSKI, Grant; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (EU).

Publicado:

— con informe internacional de búsqueda  
— con el listado de secuencias parte de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible bajo petición de la Oficina Internacional.

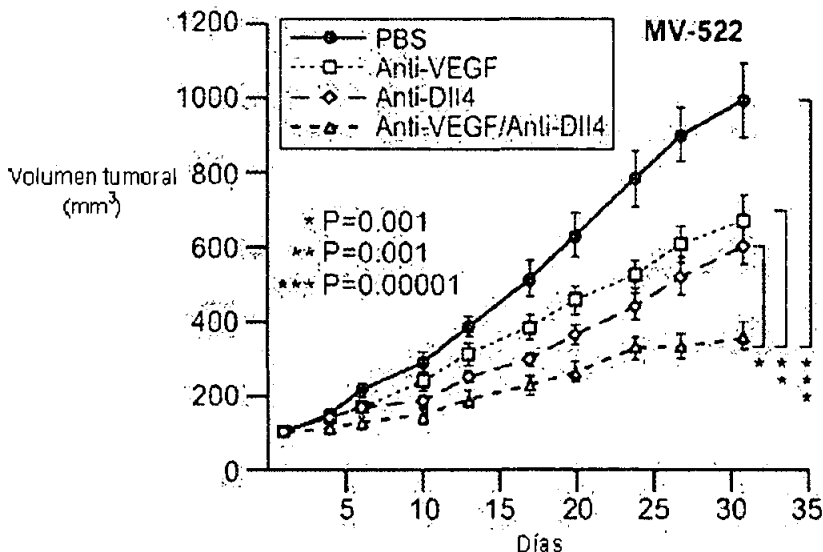
(88) Fecha de publicación del informe internacional de búsqueda: 14 de febrero de 2008

(48) Fecha de publicación de esta versión corregida: 8 de mayo de 2008

(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,

(15) Información sobre la modificación  
ver comunicación del 8 de mayo de 2008

(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA MODULACIÓN DEL DESARROLLO VASCULAR



(57) Extracto: La presente invención proporciona métodos para utilizar un modulador de DLL4 para modular el desarrollo vascular. Asimismo, se proporcionan métodos de tratamiento con moduladores de DLL4, como antagonistas de DLL4.



741

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA MODULACIÓN DEL DESARROLLO VASCULAR

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a las composiciones y los métodos que resultan útiles para la modulación del desarrollo vascular. En parte, la presente invención hace referencia al uso de antagonistas de Delta-like 4 (DLL4) para el diagnóstico y tratamiento de trastornos asociados a angiogénesis.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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 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 experimenta un nuevo remodelado; y f) las células periendoeliales 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.

15

20

25

Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003).

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.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases", En: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

30

35

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. 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

yuf

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* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, *Lancet* 340:145-146 (1992). No se conocen bien los mecanismos exactos que controlan el cambio angiogénico, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral se produce como consecuencia del equilibrio neto de diversos estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31).

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.*, citado anteriormente. El ARNm del VEGF está sobreexpresado en la mayoría de los tumores examinados en humanos. Berkman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (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.* 331:1480-1487 (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.* 37:855-868 (1996).

Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF inhiben el crecimiento de diversas líneas de células tumorales humanas en ratones atímicos desnudos (Kim *et al.*, *Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de 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

147

el 15 de octubre de 1998. Uno de los anticuerpos anti-VEGF, bevacizumab, ha sido aprobado por la FDA para su uso en combinación con un tratamiento a base de quimioterapia para tratar el cáncer colorrectal metastásico (CRC). Además, el bevacizumab se está investigando en muchos ensayos clínicos en marcha para el tratamiento de diversas indicaciones en neoplasias malignas.

5           Ante el papel de la angiogénesis en numerosos trastornos y enfermedades, sería útil contar con medios para modular uno o más de los efectos biológicos que originan esos procesos. 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.

10           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

15           La presente invención se basa en parte en el descubrimiento según el cual el desarrollo vascular se inhibe mediante el tratamiento con un agente que module la activación de la vía del receptor Notch por Delta-like-4 (denominado indistintamente "DLL4"). El tratamiento con un antagonista de DLL4 ocasionaba un aumento de la proliferación de las células endoteliales (CE), una incorrecta diferenciación de las células endoteliales y un mal desarrollo arterial de la vasculatura, incluida la vasculatura de los tumores. Sorprendentemente, el tratamiento con un anticuerpo anti-DLL4 ocasionaba la inhibición del crecimiento tumoral en varios tipos de cáncer distintos. Según esto, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para los procesos de modulación (por ejemplo, promoción o inhibición) que intervienen en la angiogénesis y para su uso en procesos patológicos asociados con la angiogénesis.

20           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 antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

25           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 antagonista anti-DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

30           En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4) a un sujeto que necesite ese tratamiento.

35           En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 (como 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.

          En un aspecto, la invención proporciona métodos para estimular la proliferación de células endoteliales, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que

148

necesite ese tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un proceso patológico asociado a angiogénesis (como un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular).

5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la diferenciación de células endoteliales, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un proceso patológico asociado a angiogénesis (como un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular).

10 En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir el desarrollo arterial, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un proceso patológico asociado a angiogénesis (como un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular).

15 En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la perfusión vascular, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un proceso patológico asociado a angiogénesis (como un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular).

20 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para mejorar la eficacia del tratamiento con un agente antiangiogénico de un sujeto que padece un proceso patológico asociado a angiogénesis, los cuales comprenden la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 en combinación con el agente antiangiogénico. Un método de este tipo será útil para el tratamiento de trastornos, por ejemplo, neoplasias malignas o enfermedades neovasculares intraoculares, en especial aquellas enfermedades o fases de trastornos que no responden apenas a un tratamiento con un agente antiangiogénico solo. El agente antiangiogénico puede ser cualquier agente capaz de reducir o inhibir la angiogénesis, incluidos los antagonistas del VEGF, como un anticuerpo anti-VEGF.

25 En un aspecto, la invención proporciona métodos que incluyen la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4) en combinación con una cantidad eficaz de otro fármaco (como un agente antiangiogénico). Por ejemplo, se usan antagonistas de DLL4 en combinación con antineoplásicos o agentes antiangiogénicos para tratar diversos procesos neoplásicos o no neoplásicos. En una forma de realización, el proceso neoplásico o no neoplásico es un proceso patológico asociado a angiogénesis. En algunas formas de representación, el otro fármaco es un antiangiogénico, un antineoplásico y/o quimioterapia.

30 El antagonista de DLL4 se puede administrar en serie o en combinación con el otro fármaco que sea eficaz para estos fines, bien en la misma composición o en otra. La administración del antagonista de DLL4 y el otro fármaco (por ejemplo, el antineoplásico, el antiangiogénico) 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. Otra posibilidad es que estos pasos se sigan secuencial y simultáneamente, combinando un método y otro, 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 del antagonista de

35

149

DLL4. No obstante, también está prevista la administración simultánea o la administración en primer lugar del antagonista de DLL4. Según esto, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4), seguida de la administración de un antiangiogénico (como un anticuerpo anti-VEGF, como bevacizumab). 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.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno (como un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular) mediante la administración de cantidades eficaces de un antagonista de DLL4 y/o uno o más inhibidores de la angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos. 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". La administración del antagonista de DLL4 y el agente quimioterapéutico 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. Otra posibilidad es que estos pasos se sigan secuencial y simultáneamente, combinando un método y otro, 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 quimioterapéutico se puede administrar primero, seguido del antagonista de DLL4. No obstante, también está prevista la administración simultánea o la administración en primer lugar del antagonista de DLL4. Por ello, en un aspecto, la invención ofrece métodos que incluyen la administración de un antagonistas de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4), seguida de la administración de un agente quimioterapéutico. 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.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un antagonista de DLL4 en la preparación de un medicamento para tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como un proceso patológico asociado a angiogénesis. En algunas formas de realización, el trastorno es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un trastorno, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un agonista de DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento. En algunas formas de realización, el trastorno está asociado a la expresión y/o actividad de las vías del receptor DLL4-Notch (como un aumento de la actividad de la vía del receptor DLL4-Notch). En algunas formas de realización, el trastorno es del tipo en el que se desea angiogénesis, neovascularización y/o hipertrofia, por ejemplo, traumatismo vascular, heridas, desgarros, incisiones, quemaduras, úlceras (por ejemplo, úlceras diabéticas, úlceras de presión, úlceras hemofílicas, úlceras varicosas), crecimiento tisular, aumento de peso, enfermedad arterial periférica, inducción del parto, crecimiento del pelo, epidermólisis bulosa, atrofia retiniana, fracturas óseas, artrodesis vertebral, desgarros de menisco, etc. En algunas formas de realización, el trastorno es

170

del tipo en el que se desea inhibición de la angiogénesis. En algunas formas de realización, el agonista de DLL4 es DBZ.

Los antagonistas y agonistas de DLL4 son conocidos en este ámbito y algunos de ellos se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es una molécula que se une a DLL4 y neutraliza, bloquea, inhibe, elimina o reduce uno o más aspectos del efecto asociado a DLL4 o interfiere con ellos. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es una molécula que se une al receptor Notch (como Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4) y neutraliza, bloquea, inhibe, elimina o reduce uno o más aspectos de los efectos asociados a DLL4 o interfiere con ellos. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es capaz de promover la proliferación de células endoteliales, al inhibir la diferenciación de las células endoteliales, al inhibir el desarrollo arterial y/o al reducir la perfusión vascular. Como se reconoce en este ámbito, la proliferación de células endoteliales, la diferenciación de las mismas, el desarrollo arterial y la función vascular (como la perfusión vascular) se pueden evaluar utilizando diversos ensayos (algunos de los cuales se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva) y expresar en función de diversos valores cuantitativos. En algunas formas de realización, la capacidad de un antagonista de DLL4 para promover la proliferación de células endoteliales, inhibir la diferenciación de células endoteliales, inhibir el desarrollo arterial y/o reducir la función vascular (como reducción de la perfusión vascular) se evalúa con respecto al nivel de proliferación de células endoteliales, diferenciación de células endoteliales, desarrollo arterial y/o función vascular (como perfusión vascular) a falta de tratamiento con el antagonista de DLL4. En algunas formas de realización, la capacidad para promover la proliferación de células endoteliales, inhibir la diferenciación de células endoteliales, inhibir el desarrollo arterial y/o reducir la función vascular (como reducción de la perfusión vascular) se determina en un ensayo *in vitro* (como en el ensayo con HUVEC descrito en la presente memoria descriptiva). En algunas formas de realización, la capacidad para promover la proliferación de células endoteliales, inhibir la diferenciación de células endoteliales, inhibir el desarrollo arterial y/o reducir la función vascular (como reducción de la perfusión vascular) se determina en un ensayo *in vivo* (como en el ensayo sobre desarrollo de la retina de ratón descrito en la presente memoria descriptiva).

El antagonista de DLL4 puede ser un anticuerpo anti-DLL4. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-DLL4 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')<sub>2</sub> o scFv. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera mostradas en la Tabla I.

Tabla I

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSV  
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVT (identificador de secuencia  
n.º: 1)

157

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFGSGS  
GSGTDFTLTISLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR (identificador de secuencia n.º: 2)

5 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.

10 Los anticuerpos humanizados 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.

15 En alguna forma de realización, el antagonista de DLL4 es una inmunoadhesina de DLL4.

20 En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más antagonistas de DLL4 y una molécula vehículo. En una forma de realización, la molécula vehículo es farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4.

25 En un aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular y dicha composición contiene una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 y una molécula vehículo farmacéuticamente aceptable, al tiempo que el uso de la misma comprende la administración simultánea o secuencial de un agente antiangiogénico. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunas formas de realización, el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti-VEGF (como bevacizumab).

30 En un aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular y dicha composición contiene una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 y una molécula vehículo farmacéuticamente aceptable, al tiempo que el uso de la misma comprende la administración simultánea o secuencial de un agente antineoplásico. En algunas formas de

realización, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunas formas de realización, el agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico. En algunas formas de realización, el uso comprende, además, la administración simultánea o secuencial de un agente antiangiogénico. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunas formas de realización, el agente antiangiogénico es un anticuerpo anti-VEGF (como bevacizumab).

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 antagonistas de DLL4 o agonistas de DLL4.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer envase que contiene una composición que incluye uno o más antagonistas de DLL4 o agonistas de DLL4; 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, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la elaboración de una composición que comprenda la adición y mezcla de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de DLL4 o de un agonista de DLL4 a una molécula vehículo farmacéuticamente aceptable.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La señalización de Notch mediada por DLL4 regula 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 2: La señalización de Notch mediada por DLL4 regula 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



173  
 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 3: 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 4: El DLL4/Notch no es 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 día durante 6 semanas) (b, e, h, k) y ratones tratados con DBZ (30 µmol/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 5: Caracterización de un anticuerpo anti-DLL4. a, Mapeo del epítipo del anticuerpo 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 µg/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 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. 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

174

(R&D System) a 2 µg/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 µg/ml, seguido de IgG-PE antihumana de cabra (1:500, Jackson ImmunoResearch) (e).

Figura 6: 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 µM). 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

### *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)); the series METHODS IN 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, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

### *Definiciones*

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, Notch2, Notch3 y Notch4). En la presente memoria descriptiva, el término "Receptor Notch" incluye cualquiera de los cuatro receptores Notch

131

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

5 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.

El "ácido nucleico de DLL4" es ARN o ADN que codifica un polipéptido de DLL4, según la definición de este dada anteriormente, o que se hibridiza con dicho ADN o ARN y permanece unido a él de forma estable en

10 condiciones de hibridación estrictas y tiene una longitud superior a 10 nucleótidos. Son condiciones estrictas aquellas que (1) emplean una baja concentración iónica y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo 0,15 M de NaCl/0,015 M de citrato sódico/0,1% de NaDodSO<sub>4</sub> a 50 °C, o (2) usan, durante la hibridación, un agente desnaturalizante como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina sérica bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato sódico a pH 6,5 con 750 mM de

15 NaCl<sub>2</sub>, 75 mM de citrato sódico a 42 °C.

Una molécula de "DLL4 quimérico" es un polipéptido que comprende DLL4 de longitud completa o uno o más dominios del mismo fusionados o unidos al polipéptido heterólogo. La molécula de DLL4 quimérico compartirá, por lo general, al menos una propiedad biológica con el DLL4 producido en la naturaleza. Un ejemplo de una molécula de DLL4 quimérico es aquella en la que el epítipo está marcado para fines de purificación. Otra

20 molécula de DLL4 quimérico es una inmunoadhesina de DLL4.

El término "inmunoadhesina de DLL4" se refiere a una molécula quimérica que combina al menos una porción de una molécula de DLL4 (nativa o una variante) con una secuencia de inmunoglobulina y se usa indistintamente con el término "quimera de la inmunoglobulina de DLL4". La secuencia de inmunoglobulina es preferentemente, aunque no necesariamente, un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las

25 inmunoadhesinas pueden presentar muchas de las valiosas propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos humanos. Como las inmunoadhesinas se pueden construir a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada enlazada a una secuencia del dominio constante (Fc) y de la región bisagra de inmunoglobulina humana, la especificidad de unión de interés se puede alcanzar utilizando componentes totalmente humanos. Estas inmunoadhesivas presentan una inmunogenicidad mínima para el paciente y son

30 seguras para su uso prolongado o repetido. En algunas formas de realización, la región Fc es una región Fc con una secuencia nativa. En algunas formas de realización, la región Fc es una variante de la región Fc. En algunas formas de realización, la región Fc es una región Fc funcional.

Entre los ejemplos de inmunoadhesinas homomultiméricas que se han descrito para uso terapéutico está la inmunoadhesina CD4-IgG para bloquear la unión del VIH a la superficie celular de CD4. Los datos obtenidos

35 en ensayos clínicos de fase I en los que se administraba CD4-IgG a mujeres embarazadas justo antes del parto, indican que esta inmunoadhesina puede ser útil en la prevención de la transmisión materno-fetal del VIH (Ashkenazi *et al.*, *Intern. Rev. Immunol.* 10:219-227 (1993)). También se ha desarrollado una inmunoadhesina

136

que se une al factor de necrosis tumoral (TNF). El TNF es una citoquina proinflamatoria que se ha demostrado que es un mediador importante del choque septicémico. Según un modelo de ratón de choque septicémico, una inmonoadhesina de un receptor del TNF ha demostrado ser un prometedor candidato para su uso clínico en el tratamiento del choque septicémico (Ashkenazi, A. *et al.*, *PNAS USA* 88:10535-10539 (1991)). El 2 de noviembre de 1998, la Food and Drug Administration estadounidense (FDA) autorizó el uso de ENBREL<sup>®</sup> (etanercept), una inmonoadhesina que contiene una secuencia del receptor TNF fusionada a una región Fc de IgG, para el tratamiento de la artritis reumatoide. La nueva indicación de ENBREL<sup>®</sup> para el tratamiento de la artritis reumatoide fue aprobada por la FDA el 6 de junio de 2000. Para obtener información reciente sobre los bloqueadores del TNF, incluido ENBREL<sup>®</sup>, véase Lovell *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 342:763-169 (2000), y el editorial que lo acompaña en las págs. 810-811; y Weinblatt *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 340:253-259 (1999); reseñado en Maini y Taylor, *Annu. Rev. Med.* 51:207-229 (2000).

Si los dos brazos de la estructura de la inmonoadhesina presentan especificidades diferentes, la inmonoadhesina se denomina "inmonoadhesina biespecífica" por analogía con los anticuerpos biespecíficos. Dietsch *et al.*, *J. Immunol. Methods* 162:123 (1993) describe este tipo de inmonoadhesina biespecífica combinando los dominios extracelulares de las moléculas de adhesión, E-selectina y P-selectina, donde cada una de estas selectinas está expresada en un tipo de células diferente en la naturaleza. Los estudios acerca de uniones indican que la proteína de fusión de la inmonoglobulina biespecífica así formada tiene una mayor capacidad de unión a una línea de células mieloides que las inmonoadhesinas monoespecíficas de las que se ha derivado.

El término "heteroadhesina" se utiliza indistintamente con la expresión "adhesina heteromultimérica química" y hace referencia a un complejo de moléculas químicas (secuencias de aminoácidos) en las que cada molécula química combina una porción biológicamente activa, como el dominio extracelular de cada uno de los monómeros del receptor heteromultimérico, con un dominio de multimerización. El "dominio de multimerización" promueve la interacción estable de las moléculas químicas dentro del complejo heteromultimérico. Los dominios de multimerización pueden interactuar a través de una secuencia de inmonoglobulina, una cremallera de leucina, una región hidrófoba, una región hidrófila o un tiol libre que forma un puente disulfuro intermolecular entre las moléculas químicas del heteromultímero químico. El dominio de multimerización puede comprender una región constante de inmonoglobulina. Además, se puede diseñar una región de multimerización de forma que las interacciones de ésteres no sólo promueven una interacción estable, sino que también promueven la formación de heterodímeros con preferencia a la de homodímeros a partir de una mezcla de monómeros. Las "protuberancias" se construyen sustituyendo cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean opcionalmente en la interfaz del segundo polipéptido mediante la sustitución de las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo, alanina o treonina). La secuencia de inmonoglobulina es preferentemente, aunque no necesariamente, un dominio constante de inmonoglobulina. La porción de inmonoglobulina en las quimeras de la

17X

presente invención se puede obtener a partir de los subtipos de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>; IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferentemente IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>3</sub>.

En la presente memoria descriptiva, el término "región Fc" se utiliza para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluidas las regiones Fc de secuencia nativa y las variantes de las regiones Fc.

Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se suele definir como la extensión desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el terminal carboxilo del mismo.

La lisina C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o generando mediante recombinación el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo.

Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos con una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

A menos que se indique lo contrario, en la presente memoria descriptiva la numeración de los residuos de una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU tal como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), incorporada expresamente a la presente memoria a modo de referencia. Por "índice EU tal como se describe en Kabat" se entiende la numeración del residuo del anticuerpo humano anti-IgG1 según EU.

Una "región Fc funcional" tiene una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Algunos ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión al C1q, la citotoxicidad dependiente de complemento, la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación descendente de receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B, BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, el dominio variable de un anticuerpo) y se pueden evaluar mediante diversos ensayos, tal y como se describen en la presente memoria descriptiva, por ejemplo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc que se puede encontrar en la naturaleza. Las regiones Fc humanas con secuencia nativa incluyen una región Fc de la IgG1 humana con secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc de la IgG2 humana con secuencia nativa; región Fc de la IgG3 humana con secuencia nativa; y región Fc de la IgG4 humana con secuencia nativa, así como las variantes de las mismas que se producen naturalmente.

Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos.

Preferiblemente, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos, en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo,

756

entre una y diez sustituciones de aminoácidos y, preferiblemente, entre una y cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental.

En la presente memoria descriptiva, la variante de la región Fc tendrá preferentemente una homología del 80% al menos, y mejor aún si es del 90% y aún mejor si llega a ser del 95%, con una región Fc de secuencia nativa y/o una región Fc de un polipéptido parental.

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 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. En cualquier caso, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en su sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos polivalentes, 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 en 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 en 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- $\beta$ , y están conectadas por tres CDR, que crean bucles que conectan la estructura de la hoja- $\beta$ , 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.

727

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')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub> y Fv, los dímeros, los anticuerpos lineales, las moléculas de anticuerpos de cadena única y los anticuerpos multiespecíficos formados a

168

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.*, *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



161

93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de 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.

5 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  
10 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  
15 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 multispecífico, 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  
20 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  
25 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 (por ejemplo, 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  
30 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  
35 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);

162

Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); las Patentes de EE.UU. n.º 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. n.º 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 and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and 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

167

Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 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 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 de receptores de Fc, la citotoxicidad celular 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 IgG segregada unida a los receptores Fc (FcR) 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,

104

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. n.º 5.500.362 ó 5.821.337 o se puede realizar el ensayo de Presta que se describe en la patente de Estados Unidos n.º 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.*, *PNAS* (EE.UU.) 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 aminoácidas 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.

16)

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 aminoácídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 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 el 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.

La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo, frente a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene carácter cíclico.

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

764

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 desregulación 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 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.

108

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 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<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> 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 nucleolitencinas, 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 etilonimas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilénofosforamida, 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 adoclesina, carclesina y biclesina); 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

168

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 II y la omega II (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-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (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 epitioestanol, el mepitiostano, 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 hidroxiiurea; el lentinán; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; el pentostatín; 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"-trichlorotrietilamina; 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



129

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 leucovorina.

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 aromatasa que inhiben el enzima aromatasa, 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 vías 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 LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa I LURTOTECAN®; el rmRH ABARELIX®; el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña doble tirosincinasa 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 daunorrubicina, 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

110

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 and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" ["Regulación del anillo 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- $\alpha$ -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

Una "enfermedad neovascular intraocular" es una enfermedad caracterizada por neovascularización ocular. Entre los ejemplos de enfermedades neovasculares intraoculares están retinopatías proliferativas, neovascularización de la coroides (NVC), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética y otras retinopatías asociadas a isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, oclusiones venosas retinianas, incluida oclusión de la vena central de la retina (OVCR), neovascularización de la córnea, neovascularización retiniana, etc.

La "patología" de una enfermedad incluye todos los acontecimientos que ponen en peligro la salud del paciente. En el caso del cáncer, incluyen crecimiento celular anómalo o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células circundantes, liberación de citoquinas u otros productos secretores a niveles anómalos, supresión o empeoramiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Por "moléculas vehículo", tal como se utiliza este término en la presente memoria descriptiva, se entienden vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores que no sean tóxicos para la célula o mamífero expuestos a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada con pH acuoso. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables están tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes azucarados, como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, como el sodio; y/o surfactantes no iónicos, como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONIC™.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco (como un polipéptido de DLL4 o un anticuerpo anti-

171

DLL4) a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma están dispuestos formando dos capas, de forma similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas.

Los términos "VEFG" y "VEGF-A" se emplean indistintamente para referirse al factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento de las células endoteliales vasculares afines de 121, 145, 183, 189 y 206 aminoácidos, como han descrito Leung *et al.*, Science, 246:1306 (1989), Houck *et al.*, Mol. Endocrin., 5:1806 (1991) y Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5):853-865 (2001), junto con las formas alélicas y procesadas de los mismos que se producen naturalmente.

Un "antagonista del VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular o reducir las actividades del VEGF, o interferir con ellas, incluida su unión a uno o más receptores del VEGF. Los antagonistas del VEGF incluyen los anticuerpos anti-VEGF y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, las moléculas receptoras y derivadas que se unen específicamente al VEGF e impiden, así, su unión a uno o más receptores, anticuerpos contra los receptores del VEGF y antagonistas de los receptores del VEGF como inhibidores de molécula pequeña de las tirosincinasas del VEGFR y proteínas de fusión, por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-gelonina (Peregrine). Los antagonistas del VEGF también incluyen variantes antagonistas de VEGF, moléculas antisentido dirigidas al VEGF, aptámeros de ARN y ribozimas contra el VEGF o los receptores del VEGF.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que une al VEGF con afinidad y especificidad suficientes. El anticuerpo anti-VEGF puede usarse como agente terapéutico para seleccionar e interferir en el desarrollo de enfermedades o procesos que implican actividad del VEGF. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.582.959, 6.703.020; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202, el documento WO2005/044853; la patente europea EP 0666868B1; las Solicitudes de Patentes de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004) y el documento WO2005012359. En general, un anticuerpo anti-VEGF no se unirá a otros homólogos de VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PlGF, PDGF o bFGF. El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMab VEGF" o "Avastin®", es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado según Presta *et al.* Cancer Res., 57:4593-4599 (1997). Incluye regiones estructurales del IgG1 humano mutado y regiones determinantes de la complementariedad de unión del antígeno procedente del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF de la murina A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93% de la secuencia de aminoácidos del Bevacizumab, incluida la mayoría de las regiones estructurales, deriva del IgG1 humano, y aproximadamente el 7% de la secuencia deriva del anticuerpo de la murina A4.6.1. El Bevacizumab tiene una masa molecular de aprox. 149.000 daltons y es glicosilado. El Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados, incluido el fragmento del anticuerpo anti-VEGF "ranibizumab", también conocido como "Lucentis®", se describe en mayor detalle en la patente de EE.UU. n.º 6.884.879, publicada el 26 de febrero de 2005.

Por "actividad biológica" y "biológicamente activo" en relación con un polipéptido de DLL4 se entienden las propiedades físicas/químicas y las funciones biológicas asociadas a DLL4. En algunas formas de realización,

172

la "actividad biológica" de DLL4 incluye una o más de las características siguientes: la unión a un receptor Notch (por ejemplo, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), la activación de un receptor Notch y la activación de la señalización molecular del receptor Notch después del extremo 3'. En este contexto, el término "modular" incluye tanto la promoción como la inhibición.

5 Por "antagonista de DLL4" se entiende una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, eliminar o reducir las actividades de un DLL4, o de interferir con las mismas, incluyendo, por ejemplo, la reducción o bloqueo de la activación de un receptor Notch, la reducción o bloqueo de la señalización molecular de un receptor Notch después del extremo 3', la alteración o bloqueo de la unión del receptor Notch a DLL4 y/o la promoción de la proliferación de células endoteliales y/o la inhibición de la diferenciación de células endoteliales y/o la inhibición de la diferenciación arterial. Entre los antagonistas de DLL4 se incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de esos anticuerpos, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control transcripcional y de traducción y otros similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de moléculas pequeñas de una proteína y proteínas de fusión, moléculas de receptores y derivados que se unen específicamente a la proteína, lo que impide su unión a su diana, las variantes de los antagonistas de la proteína, las moléculas de ARNsi que actúan sobre una proteína, las moléculas antisentido dirigidas a la proteína, los aptámeros de ARN y las ribozimas que actúan contra una proteína. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es una molécula que se une a DLL4 y neutraliza, bloquea, inhibe, elimina o reduce uno o más aspectos de la actividad biológica de DLL4 o interfiere con ella. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es una molécula que se une al receptor Notch (como Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4) y neutraliza, bloquea, inhibe, elimina o reduce una actividad biológica de DLL4 o interfiere con ella. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 modula 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 DL44 y/o al tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad del receptor Notch.

30 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 tirosincinasas 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.

5 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, pp. 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.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, entre  
10 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  
15 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 "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de los vasos sanguíneos, por ejemplo, favorece la angiogénesis, el crecimiento celular endotelial, la estabilidad de los vasos  
20 sanguíneos, y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el VEGF y los miembros de la familia de los VEGF, el PlGF, la familia de los PDGF, la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), los ligandos TIE (Angiopoietinas), las efrinas, la ANGPTL3, DLL4, etc. También incluirían a los factores que aceleran la curación de las heridas, como la hormona del crecimiento, el factor-1 de crecimiento (IGF-I) similar a la insulina, el VEGF, el factor de crecimiento de la epidermis (EGF), el  
25 CTGF y los miembros de su familia, y el TGF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$ . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara y Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, Tabla 1, que enumera los factores angiogénicos); y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003).

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor angiogénico" es una sustancia de bajo peso molecular, un  
30 polinucleótido (incluso, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o ARNsi), 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 anti-receptores VEGF, pequeñas moléculas que  
35 bloquean la señalización de los receptores de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706, o los descritos en, por ejemplo, solicitud para 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).

#### **Métodos y composiciones de la invención**

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento según el cual el desarrollo vascular se inhibe mediante el tratamiento con un agente que module la activación de la vía del receptor Notch por Delta-like-4 (denominado indistintamente "DLL4"). El tratamiento con un antagonista de DLL4 ocasionaba un aumento de la proliferación de las células endoteliales (CE), una incorrecta diferenciación de las células endoteliales y un mal desarrollo arterial de la vasculatura, incluida la vasculatura de los tumores. Sorprendentemente, el tratamiento con un anticuerpo anti-DLL4 ocasionaba la inhibición del crecimiento tumoral en varios tipos de cáncer distintos. Aunque aún no se ha demostrado, se cree que el aumento de la proliferación de células endoteliales y la alteración de la diferenciación de estas ocasiona una disfunción vascular en los tumores, lo que da lugar a la inhibición del crecimiento tumoral. Por ello, se cree que los antagonistas de DLL4 constituyen, en líneas generales, un método de tratamiento eficaz para el cáncer.

Según esto, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para los procesos de modulación (por ejemplo, promoción o inhibición) que intervienen en la angiogénesis y para su uso en procesos patológicos asociados a la angiogénesis, como cáncer.

De acuerdo con la presente invención, se considera que pueden usarse los moduladores de DLL4 y/o las combinaciones de los moduladores de DLL4 y otros agentes terapéuticos para tratar diversos trastornos.

De este modo, la invención engloba métodos para inhibir la angiogénesis que hacen uso de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4 o una inmunoadhesina de DLL4) para inhibir la activación de los receptores Notch (como Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4) originada por DLL4. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis, los cuales comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite ese tratamiento. En algunas formas de realización, el antagonista de DLL4 es capaz de promover la proliferación de células endoteliales, inhibe la diferenciación de las células endoteliales, inhibe el desarrollo arterial y/o reduce la perfusión vascular. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para estimular la proliferación de células endoteliales, inhibir la diferenciación de células endoteliales, inhibir el desarrollo arterial y/o inhibir la perfusión vascular de tumores, y dichos métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite este tratamiento.

Los ejemplos de trastornos neoplásicos que deben tratarse con un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4) incluyen los descritos en esta memoria y englobados en los términos "cáncer" y "canceroso". Los procesos no neoplásicos sensibles al tratamiento con antagonistas útiles de la invención incluyen, entre otros, por ejemplo, hipertrofia aberrante o no deseada, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis,

145

placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, edema como consecuencia de un infarto de miocardio, retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas incluida la retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de trasplante de córnea, rellazo de trasplante de córnea, neovascularización retiniana/de la coroides, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluida la enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/síndrome de distrés respiratorio del adulto, 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 y colitis ulcerosa), rechazo de trasplante renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrítico, crecimiento de masa tisular anómala o no deseada (no cáncer), obesidad, crecimiento de la masa tisular adiposa, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición de crecimiento del cabello, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preclampsia, ascitis, efusión pericárdica (como la asociada a pericarditis) y efusión pleural. Otros ejemplos de trastornos que se pueden tratar con un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4) incluyen un trastorno epitelial o cardíaco.

Para el tratamiento de los procesos patológicos pueden utilizarse los moduladores de DLL4, por ejemplo, agonistas o activadores de DLL4. En algunas formas de realización, los moduladores de DLL4, por ejemplo, los agonistas de DLL4, se pueden utilizar para el tratamiento de procesos patológicos en los que se desea conseguir la inhibición de la angiogénesis. Los moduladores de DLL4, por ejemplo, los agonistas de DLL4, pueden utilizarse también en el tratamiento de procesos patológicos en los que se desea conseguir la angiogénesis o neovascularización y/o la hipertrofia; estos procesos incluyen traumatismo vascular, heridas, desgarros, incisiones, quemaduras, úlceras (por ejemplo, úlceras diabéticas, úlceras de presión, úlceras hemofílicas, úlceras varicosas), crecimiento tisular, aumento de peso, enfermedad arterial periférica, inducción del parto, crecimiento del pelo, epidermólisis bulosa, atrofia retiniana, fracturas óseas, artrodesis vertebral, desgarros del menisco, etc.

### Tratamientos combinados

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona tratamientos combinados en los que un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4) o un agonista de DLL4 se administra con otro tratamiento. Por ejemplo, se usan antagonistas de DLL4 en combinación con antineoplásicos o agentes antiangiogénicos para tratar diversos procesos neoplásicos o no neoplásicos. 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 antagonista de DLL4 se puede administrar en serie o en combinación con otro agente terapéutico que sea eficaz para estos

finés, bien en la misma composición o en otra distinta. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar diversos inhibidores de la DLL4.

La administración del antagonista de DLL4 (o del agonista de DLL4) y el otro agente terapéutico (por ejemplo, el antineoplásico, el antiangiogénico) 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. Otra posibilidad es que estos pasos se sigan secuencial y simultáneamente, combinando un método y otro, 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 del antagonista de DLL4. No obstante, también está prevista la administración simultánea o la administración en primer lugar del antagonista de DLL4. Según esto, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4), seguida de la administración de un antiangiogénico (como un anticuerpo anti-VEGF). 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.

El médico o veterinario fijará, según su criterio, las cantidades eficaces de agentes terapéuticos que se administrarán en combinación con un antagonista de DLL4 (o un agonista de DLL4). 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 antagonista de 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 antagonistas de DLL4 y los agentes antineoplásicos son aptos para las mismas enfermedades o enfermedades similares para bloquear o reducir un proceso patológico como un tumor, un cáncer o un trastorno de proliferación celular. 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 y Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); y



17X

Sato, Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003). Véase también la solicitud de patente de Estados Unidos US20030055006. En una forma de realización, el antagonista de DLL4 se utiliza en combinación con un anticuerpo neutralizador anti-VEGF (o 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)), aptámeros capaces de bloquear el VEGF o el VEGFR, neutralizar anticuerpos anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosincinasas (RTK) del VEGFR, estrategias antisentido para el VEGF, ribozimas contra el VEGF o receptores del VEGF, variantes de 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 un antagonista de DLL4, el antagonista del VEGF y un agente antiangiogénico.

En determinados aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento neoplásico combinado con un antagonista de 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 la materia, o combinaciones de éstos). 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 un aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno (como un tumor, un cáncer o un trastorno de proliferación celular) mediante la administración de cantidades eficaces de un antagonista de DLL4 (o agonista de DLL4) y/o uno o más inhibidores de la angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos. 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". La administración del antagonista de DLL4 y el agente quimioterapéutico 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. Otra posibilidad es que estos pasos se sigan secuencial y simultáneamente, combinando un método y otro, 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 quimioterapéutico se puede administrar primero, seguido del antagonista de DLL4. No obstante, también está prevista la administración simultánea o la administración en primer lugar del antagonista de DLL4. Por ello, en un aspecto, la invención ofrece métodos que incluyen la administración de un antagonista de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4), seguida de la administración de un agente quimioterapéutico. 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.

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.

#### **Crecimiento tumoral recidivante**

La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células cancerosas. 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 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células cancerosas en un sujeto mediante la administración de uno o más antagonistas de DLL4 (o agonistas de 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 antagonistas de DLL4 se administran simultáneamente con tratamiento para el cáncer. De manera alternativa o adicional, el tratamiento con antagonistas de DLL4 se 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

174

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), 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; la patente europea 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. Se pueden administrar otros agentes adicionales en combinación con antagonistas del VEGF y un antagonista de DLL4 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o la proliferación recidivante de células tumorales, por ejemplo, véase el apartado Terapias combinadas en la presente memoria descriptiva.

#### DLL4

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); MNL (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). Las secuencias de aminoácidos y el ácido nucleico de DLL4 son conocidas en el sector y se abordan más adelante en la presente memoria descriptiva. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la DLL4 se puede diseñar utilizando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de DLL4. Alternativamente, se puede utilizar la secuencia de ADNc de DLL4 (o fragmentos de ésta). El número de entrada de la DLL4 humana es NM\_019074 y el número de entrada de la DLL4 murina es NM\_019454.

DLL4 se une a los receptores Notch. La vía de los receptores Notch conservada en la línea evolutiva es un regulador clave de muchos procesos de desarrollo, así como de muchos órganos que se autorenewan tras el nacimiento. Desde los invertebrados a los mamíferos, la señalización de los receptores Notch guía a las células a través de múltiples decisiones que deben tomar e influye la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Miele y Osborne, 1999). La familia de receptores Notch está formada por receptores de la superficie celular que han conservado su estructura y que se activan mediante ligandos unidos a la membrana de la familia de genes DSL (que reciben su nombre de Delta y Serrate, de la drosófila, y Lag-2, de *C. elegans*). Los mamíferos tienen cuatro receptores (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4) y cinco ligandos (Jag1, Jag2, DLL1, DII3 y DLL4). Por la activación ocasionada por los ligandos presentes en las células circundantes, los receptores Notch se ven sometidos a sucesivas escisiones proteolíticas. Esto da lugar a la liberación del dominio intracelular Notch (NICD), que se transloca en el núcleo y forma un complejo transcripcional con la proteína de unión al ADN, RBP-

120

Jk, también conocida por CSL [por CBF1/Su(H)/Lag-1] y otros cofactores transcripcionales. Los genes diana primarios de la activación de los Notch incluyen la familia de genes HES (Hairy/Enhancer of Split, es decir, Intensificador piloso de las proteínas split) y los genes asociados a HES (Hey, CHF, HRT, HESR), que, a su vez, regulan a los efectores transcripcionales situados después del extremo 3' de forma específica para un tejido y tipo celular (Iso *et al.*, 2003; Li y Harris, 2005).

#### Moduladores de DLL4

Los moduladores de DLL4 son moléculas que modulan la actividad de DLL4, como por ejemplo, agonistas y antagonistas. El término "agonista de DLL4" se utiliza para hacer referencia a análogos peptídicos y no peptídicos de DLL4 (como el DLL4 multimerizado descrito en la presente memoria descriptiva) y a otros agentes, siempre que tengan la capacidad de transmitir señal a través de un receptor Notch nativo (por ejemplo, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4). El término "agonista" se define en el contexto de la función biológica de un receptor Notch. En determinadas formas de realización, los agonistas tienen las actividades biológicas de un DLL4, tal y como se definen anteriormente, como la unión a un receptor Notch (por ejemplo, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), la activación de un receptor Notch y la activación de la señalización molecular de un receptor Notch después del extremo 3'. En algunas formas de realización, los agonistas de DLL4 inhiben la proliferación de células endoteliales, promueven la diferenciación de células epiteliales y/o promueven el desarrollo arterial. En algunas formas de realización, los agonistas de DLL4 inhiben el desarrollo vascular.

Los moduladores de DLL4 son conocidos en este ámbito y algunos de ellos se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva. En la presente memoria descriptiva, en el apartado "Definiciones", se proporciona una lista, a modo de ejemplo, de antagonistas de DLL4 (como un anticuerpo anti-DLL4 y una inmunoadhesina de DLL4).

Los moduladores útiles de la presente memoria descriptiva se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la materia. En algunas formas de realización, los antagonistas de DLL4 se caracterizan por uno o más de los elementos siguientes: la unión a DLL4, la unión a un receptor Notch, 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, los agonistas de DLL4 se caracterizan por uno o más de los factores siguientes: unión a un receptor Notch (por ejemplo, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), activación de un receptor Notch, activación de la señalización molecular de un receptor Notch después del extremo 3', inhibición de la proliferación de células endoteliales, promoción de la diferenciación de células epiteliales y/o promoción del desarrollo arterial. Los métodos para caracterizar a los antagonistas y agonistas de DLL4 son conocidos en este ámbito y algunos de ellos se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva.

121

### Anticuerpos

Los anticuerpos anti-DLL4 son conocidos en este ámbito y algunos de ellos se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos anti-DLL4 son, preferentemente, monoclonales. También se incluyen dentro del ámbito de la invención fragmentos de anticuerpos como los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')<sub>2</sub>, 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 obtenerse anticuerpos monoclonales anti-DLL4 utilizando el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. 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 lípido 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

187

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. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito 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 que las células de hibridoma producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer 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 cultivarse *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 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 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

124

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 interactúen 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 virgenes 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 contengan 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 otra se segrega 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

1287

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.

5 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).

10 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

15 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 de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se acoplen a los extremos 5' y 3' de los genes de VH y 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

20 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

25 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

30 nueva amplificación de la PCR con un cebador marcado, como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

35



12p

A partir de segmentos de genes V se pueden derivar *in vitro* 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 mapeado (explicados en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluidas 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 producir con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle de H3 largo de una longitud única, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de V $\kappa$  y V $\lambda$  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 procedimientos 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 (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 de 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.*,

12

(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 procedimiento 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<sup>-9</sup> M.

Las secuencias de aminoácidos y el ácido nucleico de DLL4 son conocidas en el sector y se abordan más adelante en la presente memoria descriptiva. 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.

188

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  $\text{CaPO}_4$ . 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.

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.

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 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 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 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

124

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). 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 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 de disociación lenta (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 difirieran 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 deseados 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 deseadas se pueden enriquecer

190

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 con representación en fagos 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 codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv se puede 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 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 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.

JAM

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')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro método, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')<sub>2</sub> 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.

#### *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 método 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 los residuos probablemente desempeñan 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 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 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, pp. 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); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7: 33 (1993).

193

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 transplante 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 ejemplo, saporin, anti-interferón- $\alpha$ , 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')<sub>2</sub>).

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).

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



raf

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.

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).

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 CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, 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 triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) 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 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 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 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')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito

141

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 mercaptoetilamina 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) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')<sub>2</sub> 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 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 realizar 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

146

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 contempla la modificación o modificaciones 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 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 descritas 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; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US

Vax

2004/0110282; US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento 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 con eliminación de un gen, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 y células CHO con eliminación de un gen (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 2, 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 2, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos.

Val

Tabla 2

| 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                       |
| Cis (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;

200

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lis, arg;

(5) residuos que tiene influencia en la orientación de la cadena: gli, pro; y

(6) aromáticos: trp, tir, fe.

5 Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 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.

25 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.

30 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones en los aminoácidos en la región Fc de polipéptidos de inmunoglobulina, 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 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub> humanas) que contenga una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluida la de la cisteína bisagra.

35 Según esta descripción y los conocimientos del sector, se contempla que en algunas formas de realización un anticuerpo utilizado en los métodos 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

201

pueden realizar algunas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión C1q alterada (es decir, bien mayor o menor) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento 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 el documento WO94/29351 relativos a 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 mejorada o disminuida. 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) y 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 aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 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 pueden modificarse aún más para que contengan fracciones no proteínicas adicionales que son conocidas en el sector 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 propilpropileno / 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 invención se pueden caracterizar por sus propiedades físico-químicas y por sus funciones biológicas mediante varios ensayos conocidos en la especialidad. En algunas formas de realización, los anticuerpos están caracterizados por uno o más sitios de unión a DLL4; reducción o bloqueo de la activación del receptor Notch; reducción o bloqueo de la señalización molecular en el extremo 3' del receptor Notch; 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.

5            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 desnaturizante de exclusión por tamaño (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

10            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

15            inmunoensayos de proteína A. Los ensayos de unión a antígeno ilustrativos se incluyen más adelante en la sección Ejemplos.

             Los anticuerpos anti-DLL4 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, algunos de los cuales se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva. Por

20            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, 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

25            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, el anticuerpo es un anticuerpo alterado que tiene parte, 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

30            ADCC) son innecesarias o dañinas. En algunas formas de realización, se miden las actividades Fc de la 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

35            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(RII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas

203

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. n.º 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.*, PNAS (EE.UU.) 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, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para su 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 polipeptídicos del anticuerpo 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.

201

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  $\lambda$ GEM™-II 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 puede comprender dos o más pares de promotores de cistrón, 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 cistrón 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 cistrón 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 cistrón 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. 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 formas de realización, 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  $\beta$ -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 cistrón 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

20

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, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una forma de realización de la invención, las secuencias de señal usadas en los dos cistrones del sistema de expresión son 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, 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 incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, como microorganismos grampositivos o gramnegativos. Entre los ejemplos de 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; n.º en depósito en ATCC 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 con el genotipo W3110  $\Delta$ fhuA ( $\Delta$ tonA) ptr3 lac Iq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$ (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*  $\lambda$  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 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 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 transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

204

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

5 sustancias 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 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 formas de realización, los medios también contienen

10 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

15 agentes reductores seleccionados a partir del grupo formado por glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitrol.

Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. El cultivo 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

20 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 en el vector de expresión se utiliza un promotor inducible, 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

25 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 forma de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el

30 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

35 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 OD<sub>550</sub> 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. 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. Están disponibles algunas cepas de E. coli con deficiencia de proteasas, las cuales se describen, 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).

202

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 inmunoafinidad, 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. 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 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 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 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 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

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.

209

## (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 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 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.º 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 eucarióticos 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: 3). 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: 4). 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



210

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 polioma 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' a 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

211

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 humanas de pulmón (W138, 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 descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes de Estados Unidos 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 Estados Unidos Re. 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), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

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).

#### Inmunos conjugados

La invención también proporciona inmunos conjugados (también denominados "conjugados de anticuerpos con fármacos" o "ADC"), que comprenden anticuerpos anti-DLL4 conjugados 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).

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

217

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 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), 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.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) 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 <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y 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 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 (Inmugen, Inc.), un conjugado de anticuerpo con fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado al grupo de fármacos de los maitansinoides por medio de un enlazador de disulfuro SPP, DM1, está bien avanzado en ensayos clínicos de Fase II para el 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 auriestatinós, la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a 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 mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la

214

difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modicina 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 gèlonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el tricotecenos. 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  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ . 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 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-dinitrobenzoceno). 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. 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 formas de realización, el immunoconjugado comprende un anticuerpo (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 immunoconjugados 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

211

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  $3 \times 10^5$  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 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 0 425 235 B1, y 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 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),

214

5 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-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoyl)-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 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.

10 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 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 3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

15 ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunas formas de realización, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo conjugado 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 antineoplásica (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 (documento WO 02/088172).

25 Entre los ejemplos de formas de realización de auristatina se 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", EE.UU n.º de ser. 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, pp 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-cáncer 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", EE.UU. n.º de ser. 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, por

u X

ejemplo, enlazadores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como conjugados MMAE/MMAF a enlazadores).

### iii. Caliqueamicina

En otras formas de realización, el immunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina 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 calicheamicina que se pueden utilizar se incluyen  $\gamma$ 11,  $\alpha$ 21,  $\alpha$ 31, N-acetil- $\gamma$ 11, PSAG y  $\theta$ 11 (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 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 modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca 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 immunoconjugado 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  $^{99m}Tc$  o  $^{112}In$ , 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.



21 ✓

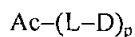
Pueden incorporarse marcadores radiactivos o de otro tipo al conjugado utilizando las formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, fluorina-19 en vez de hidrógeno. Etiquetas como  $^{99m}\text{Tc}$  o  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  e  $^{111}\text{In}$  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 ácido lábil, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127131 (1992); patente de EE.UU. n.º 5.208.020).

Los compuestos 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), un anticuerpo (Ab) se conjuga con una o más porciones de un fármaco (D), por ejemplo, de 1 a 20 porciones de fármaco 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.



I

219

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-fe"), 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-fe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gli-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gli-gli-gli). 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 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). 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) Bioconjugados Químicos 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 ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

#### **Modificaciones covalentes en polipéptidos de DLL4**

En el ámbito de esta invención se incluyen modificaciones covalentes de antagonistas o agonistas polipeptídicos (por ejemplo, un fragmento de antagonistas polipeptídicos, una molécula de fusión con DLL4 (por ejemplo, una inmunoadhesina de DLL4), un anticuerpo anti-DLL4). Dichas modificaciones pueden ser síntesis químicas o una escisión enzimática o química del polipéptido, de ser aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del polipéptido se insertan en la molécula mediante residuos de aminoácidos reactivos dirigidos del polipéptido con un agente derivatizante orgánico capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de los terminales N o C, o mediante la incorporación de un aminoácido modificado o no natural en la cadena en crecimiento del polipéptido. Véase, por ejemplo, Ellman *et al.*, Meth. Enzym. 202:301-336 (1991); Noren *et al.*, Science 244:182 (1989); y publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos 20030108885 y 20030082575.

Los residuos cisteinilos reaccionan generalmente con haloacetatos- $\alpha$  (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetil o carboxiamidometil. Los residuos cisteinilos también se derivan mediante reacciones con bromotrifluoroacetona,  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-

721

imidozol) ácido propiónico, fosfato cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos histidilos se derivan mediante reacción con dietilpirocarbonato con pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilos. El bromuro para-bromofenacil también es útil y la reacción se lleva a cabo generalmente en cacodilato de sodio 0,1 M con pH 6,0.

Los residuos lisinilos y de amino terminales reaccionan con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilos. Otros reactivos para la derivatización de residuos que contengan  $\alpha$ -amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimidato, fosfato de piroxidal, piroxidal, cloroborohidrido, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos arginilos se modifican mediante reacción con uno o más reactivos convencionales, entre los que se encuentran fenilglioxal, 2,3-butanediona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al alto  $pK_a$  del grupo funcional de guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como también con los grupos amino epsilon de arginina.

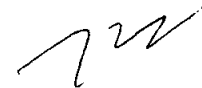
La modificación específica de los residuos tirosilos puede realizarse con un interés especial en la inserción de etiquetas espectrales en dichos residuos mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Generalmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de tirosilos O-acetilos y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilos se yodan utilizando  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para utilizarlas en radioinmunoensayos.

Los grupos laterales carboxilos (aspartil o glutamil) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ( $\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R}'$ ), en las que R y R' son diferentes grupos alquilos, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartilos y glutamilos se convierten en residuos asparaginilos y glutaminilos mediante reacción con iones de amonio.

Los residuos glutaminilos y asparaginilos se desamidan frecuentemente a los residuos glutamilos y aspartilos correspondientes, respectivamente. Estos residuos se desamidan en condiciones neutrales o básicas. La forma desamidada de estos residuos se encuentra dentro del campo de la presente invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilos de residuos serilos y treonilos, metilación de grupos  $\alpha$ -amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de amino N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica el apareamiento químico o enzimático de glicosidas a un polipéptido de la invención. Estos procedimientos tienen la ventaja de que no requieren la producción del polipéptido en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para glicosilación unida por enlace O o N. Dependiendo del modo de apareamiento utilizado, el azúcar o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilos libres, (c) grupos sulfhidrilos libres, tales como los de la cisteína, (d) grupos



hidroxilos libres, tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

La eliminación de cualquier porción de carbohidratos presente en un polipéptido de la invención deberá realizarse química o enzimáticamente. La deglicosilación química requiere la exposición del polipéptido al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico u otro compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de casi todos o todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que el polipéptido permanece intacto. La deglicosilación química se describe en Hakimuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) y en Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de porciones de carbohidratos, como por ejemplo, en anticuerpos, puede llevarse a cabo mediante el uso de diversas endo- y exo-glicosidasas, tal como se describe en Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol. 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de la invención comprende la unión del polipéptido a uno de diversos polímeros no proteínicos, como por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxilalquilenos, tal como se establece en la patentes de Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

#### Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo 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 metal o propel 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 hidrofilicos 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 ejemplo, 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.

229

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 el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos 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  $\gamma$  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 periodos 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.

También se contempla que un agente útil en la invención se pueda introducir en un sujeto mediante terapia génica. La terapia génica hace referencia a la terapia que se lleva a cabo mediante la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En las aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en las células con el fin de obtener la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz para el reemplazo de un gen defectuoso, por ejemplo. La "terapia génica" comprende tanto la terapia génica convencional, en la que se obtiene un efecto duradero mediante un único tratamiento, y la administración de agentes génicos terapéuticos, que involucran la administración única o reiterada de ADN o ARNm terapéuticamente eficaces. Los ADN y ARN antisentido pueden utilizarse como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Véase, por ejemplo, ARNsi-DLL4, descrito en los Ejemplos. Ya se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido cortos pueden importarse hacia las células en las que actúan como inhibidores, a pesar de contar con concentraciones intracelulares bajas a causa de la absorción restringida de la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986)). Es posible modificar los oligonucleótidos para aumentar su

absorción, por ejemplo, sustituyendo los grupos de fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados. Para obtener revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase, por ejemplo, Goldspiel *et al.*, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu y Wu *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan *Science* 260:926-932 (1993); Morgan y Anderson *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); y May *TIBTECH* 11:155-215 (1993). Los métodos habitualmente conocidos en la tecnología del ADN recombinante que son de utilidad se describen en Ausubel *et al.*, eds. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; y Kriegler (1990) *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY.

#### *Dosificación y administración*

Las moléculas se administran a un paciente humano de acuerdo con los procedimientos conocidos, como por ejemplo la administración intravenosa como un bolo o una infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramusculares, intraperitoneales, cefalorraquídeas, subcutáneas, intraarticulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o por inhalación.

En algunas formas de realización, el tratamiento de la invención supone la administración combinada de un antagonista de DLL4 y de uno o más agentes antineoplásicos, por ejemplo, agentes antiangiogénicos. En una forma de realización están presentes agentes antineoplásicos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes antiangiogénicos diferentes, uno o más agentes quimioterápicos, etc. La invención también contempla la administración de inhibidores múltiples, por ejemplo, anticuerpos múltiples para el mismo antígeno o anticuerpos múltiples para diferentes moléculas activas del cáncer. En una forma de realización se administró un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos con el antagonista de DLL4 y/o uno más agentes antiangiogénicos. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única y/o la administración consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, un antagonista de DLL4 puede preceder, seguir o alternarse con la administración de los agentes antineoplásicos o puede administrarse simultáneamente con ellos. En una forma de realización, existe un periodo en el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del antagonista de DLL4 dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, tal y como se define anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el inhibidor se administra para fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al inhibidor, y el criterio del médico que trata al paciente. El inhibidor se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. En un tratamiento combinado, las composiciones de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Como se usa en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz es la que consigue que la administración de una composición de la invención y/o la coadministración de un antagonista de DLL4 y de uno o más agentes terapéuticos dé como resultado la reducción o inhibición de la enfermedad o proceso contra el que se está actuando. El efecto de la administración de una combinación de agentes puede ser aditivo. En una forma de realización, el resultado de la administración es un efecto sinérgico. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de antagonista de DLL4 y de uno o más agentes terapéuticos., por ejemplo, un inhibidor de la

225

angiogénesis, necesaria para reducir sinérgica o significativamente o eliminar los procesos o síntomas asociados a una enfermedad determinada.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20mg/kg) de antagonista de DLL4 o de un inhibidor de la angiogénesis, ya sea, por ejemplo, mediante una o más dosis administradas por separado o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. 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. No obstante, también pueden ser útiles otras pautas posológicas. Generalmente, el médico administrará una o más moléculas hasta obtener una dosis que proporcione el efecto biológico requerido. El progreso del tratamiento de la invención se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Por ejemplo, la preparación y programación de las dosis para los inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, como AVASTIN® (Genentech), pueden realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determinado empíricamente por el médico cualificado. En otro ejemplo, la preparación y programación de las dosis para dichos agentes quimioterapéuticos puede realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o tal y como lo determine empíricamente el médico cualificado. La preparación y la pauta posológica de los ciclos de quimioterapia se describen también en *Chemotherapy Service*, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

#### *Eficacia del tratamiento*

La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante diversos puntos de valoración comúnmente usados en la evaluación de los trastornos neoplásicos o no neoplásicos. Por ejemplo, los tratamientos contra el cáncer pueden evaluarse mediante, por ejemplo, aunque sin limitarse a ello, la regresión del tumor, la reducción del peso o el tamaño del tumor, el tiempo de progresión, la duración de supervivencia, la supervivencia sin progresión, la duración de respuesta y la calidad de vida. Puesto que los agentes antiangiogénicos aquí descritos tienen como objetivo la vasculatura del tumor y no necesariamente las células neoplásicas mismas, representan una clase única de fármacos contra el cáncer y por lo tanto pueden requerir mediciones y definiciones únicas de las respuestas clínicas a los fármacos. Por ejemplo, una reducción del tumor superior al 50% en un análisis bidimensional es el límite estándar para proclamar una respuesta. Sin embargo, los inhibidores pueden provocar inhibición de la extensión metastásica sin reducción del tumor original, o simplemente pueden tener un efecto tumorestático. Por lo tanto, pueden emplearse distintos procedimientos para determinar la eficacia de la terapia, entre los que se incluyen a modo de ejemplo, la medición del plasma o de los marcadores urinarios de la angiogénesis y la medición de la respuesta a través de imágenes radiológicas.

Los siguientes Ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y de ningún modo se proponen limitar el alcance de la presente invención.

El contenido de todas las patentes y documentos científicos citados en la presente memoria descriptiva quedan expresamente incorporados en la misma en su integridad a modo de referencia.



## 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 de 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  $8 \times 10^4$  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  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 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 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.

227

**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  $5 \times 10^6$  células HM7 de cáncer de colon humanas,  $10 \times 10^6$  células Colo205 humanas de carcinoma de colon,  $10 \times 10^6$  células Calu6 humanas de carcinoma de pulmón,  $10 \times 10^6$  células MV-522 humanas de carcinoma de pulmón,  $10 \times 10^6$  células WEHI-3 murinas de leucemia,  $10 \times 10^6$  células EL4 murinas de linfoma,  $10 \times 10^6$  células SK-OV-3 X1 humanas de cáncer de ovario,  $10 \times 10^6$  de células LL2 murinas de cáncer de pulmón,  $10 \times 10^6$  células EL4 de linfoma/leucemia o  $10 \times 10^6$  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 ( $5 \times 10^6$ ) 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 ( $1 \text{ mm}^3$ ): 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 ( $\text{mm}^3$ ) 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  $\mu\text{g}$  en 150  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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 NMI, 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: 5) (Oligo 1, sentido),  
 AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT (identificador de secuencia n.º: 6) (Oligo 1, antisentido),  
 CAACTGCCCTTCAATTTTCATT (identificador de secuencia: 7) (Oligo 2, sentido),  
 TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT (identificador de secuencia n.º: 8) (Oligo 2, antisentido),  
 TGACCAAGATCTCAACTACTT (identificador de secuencia n.º: 9) (Oligo 3, sentido),  
 GTAGTTGAGATCTTGGTCATT (identificador de secuencia n.º: 10) (Oligo 3, antisentido),  
 GGCCAACTATGCTTGTGAATT (identificador de secuencia n.º: 11) (Oligo 4, sentido),  
 TTCACAAGCATAGTTGGCCTT (identificador de secuencia n.º: 12) (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 lavaron 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 ( $\pm$ 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, TGF $\beta$ 2 y GAPDH fueron las siguientes:

#### TGF $\beta$ 2

Anverso: GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (identificador de secuencia n.º: 13)

Reverso: CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (identificador de secuencia n.º: 14)

Sonda: AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (identificador de secuencia: 15)

#### VEGFR2

Anverso: CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (identificador de secuencia n.º: 16)

Reverso: TGC AGT CCG AGG TCC TTT (identificador de secuencia n.º: 17)

Sonda: CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (identificador de secuencia n.º: 18)

#### GAPDH

Anverso: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (identificador de secuencia n.º: 19)

Reverso: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (identificador de secuencia n.º: 20)

Sonda: CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (identificador de secuencia n.º: 21)

#### Ejemplo 2: Generación de anticuerpos anti-DLL4 en fagos

Las librerías de representación de anticuerpos en 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 inmunoplasmas 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, citado anteriormente). 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.

Nº 40

**Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos 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 5a 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 5b). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 5b. 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 5c, 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 5d, 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).

257

El anticuerpo monoclonal anti-DLL4 YW26.82 se unía específicamente a DLL4 expresado endógenamente en células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC). Se realizó 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 Figura 5e. 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 4: 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 1a). El procesamiento proteolítico de Notch, catalizado por la actividad de la  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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. 1b). 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. 1c). Estos datos indican que el estado de activación de la señalización de Notch/DLL4 está estrechamente asociado a la proliferación de células endoteliales.

#### **Ejemplo 5: 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 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

232

una estructura en forma de hoja con una morfología vascular primitiva (Fig. 1d). Se observó un aumento significativo de la marcación con Ki67 en células endoteliales, lo que indicaba una proliferación elevada de células endoteliales (Fig. 1h). 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 6: 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, 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 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 6), 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 DLL4 humano marcado con His inmovilizado en el extremo C terminal (aminoácidos 1-404) en ausencia o presencia de DBZ (0,08 µM). 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 monoclonal anti-VEGF eliminaba la mayor parte de la formación de brotes de células endoteliales, bien en presencia bien en ausencia de DBZ (Fig. 1f), 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. 1g). En cambio, la activación de Notch por DLL4 inmovilizada suprimía la expresión del VEGFR2 (Fig. 1g). 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 7: 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. 2a), 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. 2c). Esta observación fue sorprendentemente similar al desarrollo arterial defectuoso en embriones DLL4+/-.

239

Estos datos, desde distintos ángulos, resaltan el papel esencial de DLL4/Notch en la regulación de la diferenciación de células endoteliales.

**Ejemplo 8: La expresión de TGFβ estaba asociada al estado de activación del Notch**

De forma similar a la vía del Notch, la señalización del TGFβ depende del contexto y tiene efectos diversos y con frecuencia opuestos sobre la diferenciación, proliferación e inhibición del crecimiento celular. Además, la vía del TGFβ 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 I similar al receptor de la activina (ALK1), un receptor de tipo I del TGFβ 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 TGFβ2 (Fig. 2b) estaba estrechamente asociada al estado de activación de Notch, lo que indica que la vía del TGFβ 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 TGFβ fomente la diferenciación de las células endoteliales.

**Ejemplo 9: 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 3a-d). En modelos tumorales xenotrasplantados Calu6, Colo205 y HM7 (Figuras 3a-c), el tratamiento con YW26.82 se inició tras la determinación del tumor ( $\geq 250 \text{ mm}^3$  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 pániculos 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. 3d).

También investigamos el impacto del bloqueo de DLL4 y/o VEGF en el crecimiento de numerosos tumores en modelos tumorales preclínicos (Figuras 3e-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 10: 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 E14 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. 3g). En cambio, el anticuerpo anti-VEGF tenía un efecto completamente opuesto (Fig. 3g), aunque los dos tratamientos presentaban una eficacia similar en este modelo.

**Ejemplo 11: 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. 2a), 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. 3h). 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 12: 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  $\gamma$ -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. 4). Además, el anticuerpo

23)

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. 4). Estos resultados apoyan la idea de que la señalización de Notch/DLL4 está limitada en gran parte al sistema vascular.

**Ejemplo 13: 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. 2d). 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.

Se considera que lo expuesto hasta el momento en la presente memoria descriptiva es suficiente para permitir que un experto en este sector aplique la invención. No obstante, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria descriptiva, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones incluidas más adelante.

136

LAS REIVINDICACIONES SON:

1. 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 antagonista de DLL4 a un sujeto que necesite dicho tratamiento, mediante el cual se trata el tumor, el cáncer o el trastorno de proliferación celular.

2. El método de la reivindicación 1, donde el tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular es cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma o linfoma.

3. Un método para el tratamiento de un proceso patológico asociado a angiogénesis que comprenda la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 a un sujeto que precise dicho tratamiento, mediante el cual se trata el proceso patológico asociado a angiogénesis y donde el antagonista de DLL4 es capaz de estimular la proliferación de células endoteliales, inhibir la diferenciación de células endoteliales, inhibir el desarrollo arterial o inhibir la perfusión vascular.

4. El método de la reivindicación 3, en la que el proceso patológico asociado a angiogénesis es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

5. El método de la reivindicación 3, donde el proceso patológico asociado a angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

6. Un método para estimular la proliferación de células endoteliales en un sujeto que precise dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un agonista de DLL4 al sujeto y mediante el cual se estimula la proliferación de células endoteliales.

7. Un método para reducir o inhibir la diferenciación de células endoteliales en un sujeto que precise dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 al sujeto y mediante el cual se inhibe la diferenciación de células endoteliales.

8. Un método para reducir o inhibir el desarrollo arterial en un sujeto que precise dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 al sujeto y mediante el cual se inhibe el desarrollo arterial.

9. Un método para reducir o inhibir la perfusión vascular de un tumor en un sujeto que precise dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 al sujeto y mediante el cual se inhibe la perfusión vascular de tumores.

238

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende, además, la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico.

11. El método de la reivindicación 10, donde el agente angiogénico se administra antes o inmediatamente después de la administración del antagonista de DLL4.

12. El método de la reivindicación 10, donde el agente angiogénico se administra simultáneamente con el antagonista de DLL4.

13. El método de cualquiera de las reclamaciones 10-12, donde el agente antiangiogénico es un antagonista del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF).

14. El método de la reivindicación 13, donde el antagonista del VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

15. El método de la reivindicación 14, donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que supone administrar también una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

17. Un método para mejorar la eficacia de un antiangiogénico en un sujeto con un proceso patológico asociado a angiogénesis, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4 en combinación con el antiangiogénico, lo que permite aumentar la actividad inhibidora de dicho antiangiogénico.

18. El método de la reivindicación 17, en la que el proceso patológico asociado a angiogenia es un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

19. El método de la reivindicación 17, donde el proceso patológico asociado a angiogénesis es una enfermedad neovascular intraocular.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el antagonista de DLL4 es una inmunoadhesina de DLL4.

22. El método de la reivindicación 20, donde el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo monoclonal.

270

23. El método de la reivindicación 20, donde el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

5 24. El método de la reivindicación 20, donde el anticuerpo anti-DLL4 es un fragmento de anticuerpo.

25. El método de la reivindicación 24, donde el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> o scFv.

10

234

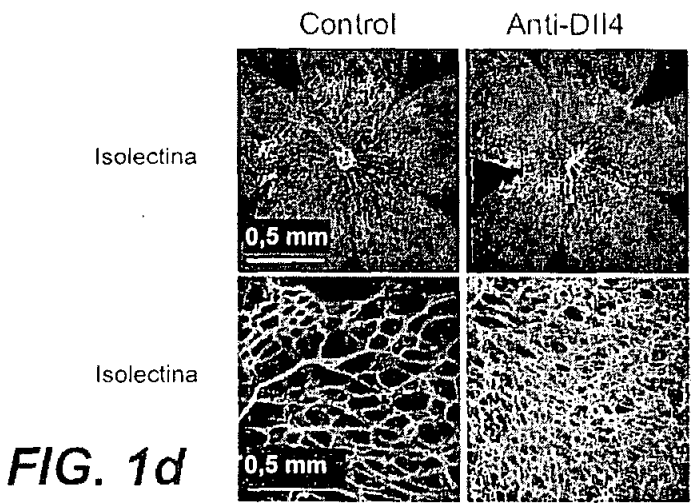
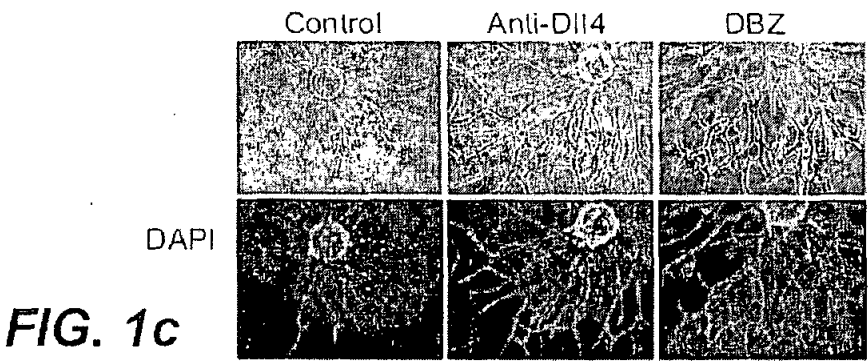
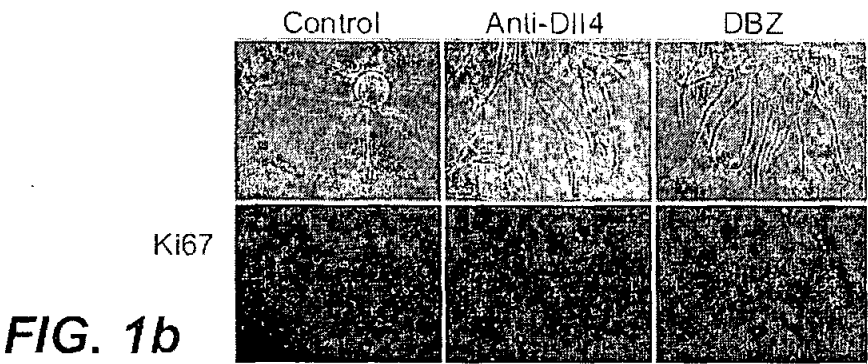
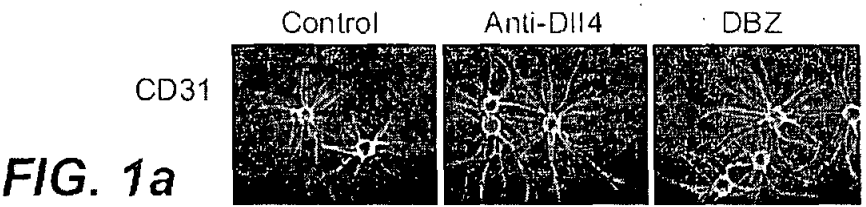
## RESUMEN

- 5 La presente invención proporciona métodos para utilizar un modulador de DLL4 para modular el desarrollo vascular. Asimismo, se proporcionan métodos de tratamiento con moduladores de DLL4, como antagonistas de DLL4.

210

P2372R1

1 / 17



241

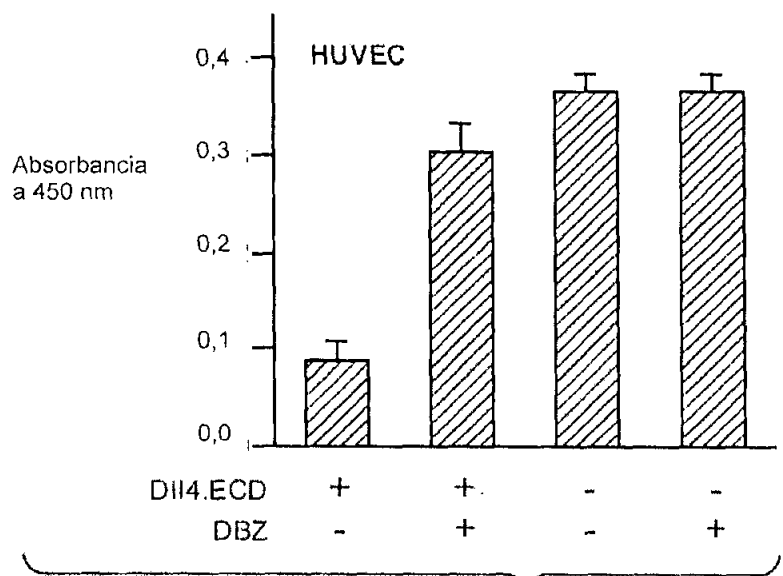


FIG. 1e

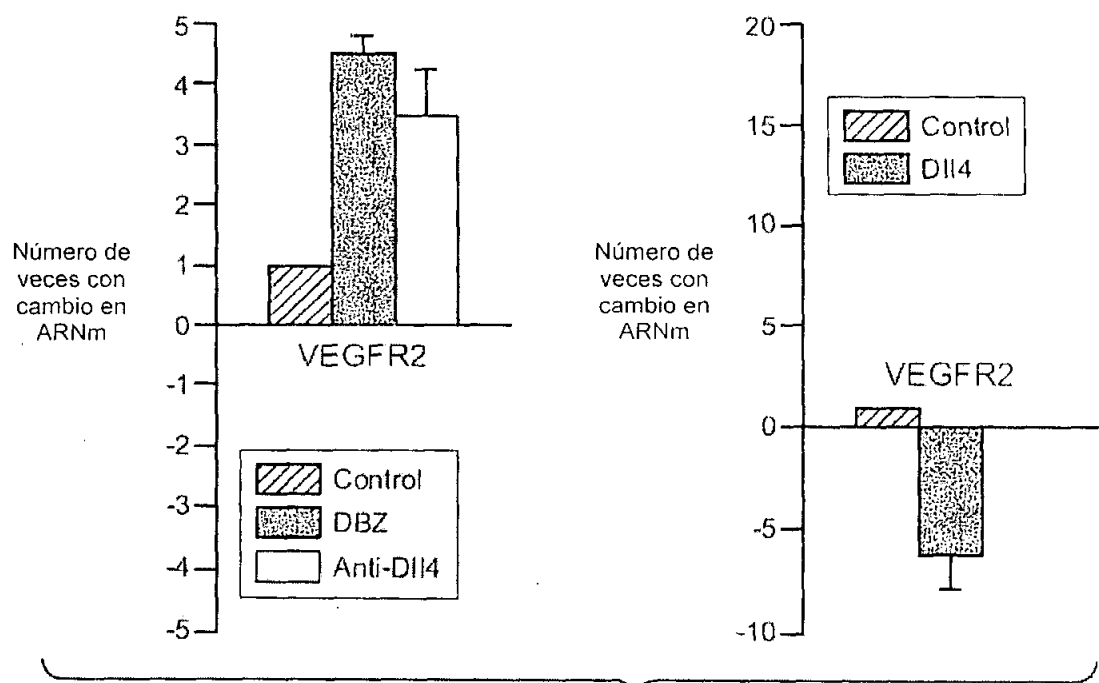


FIG. 1g



244

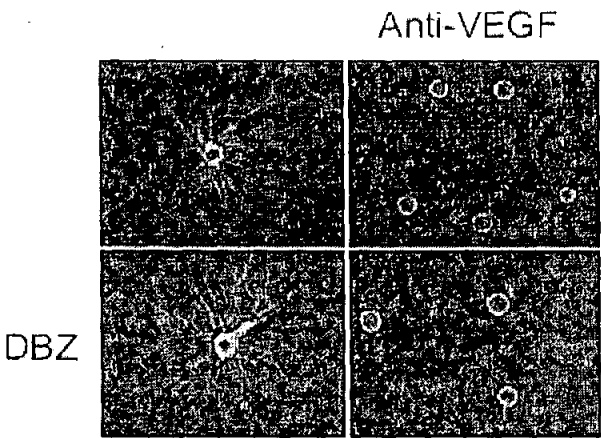


FIG. 1f

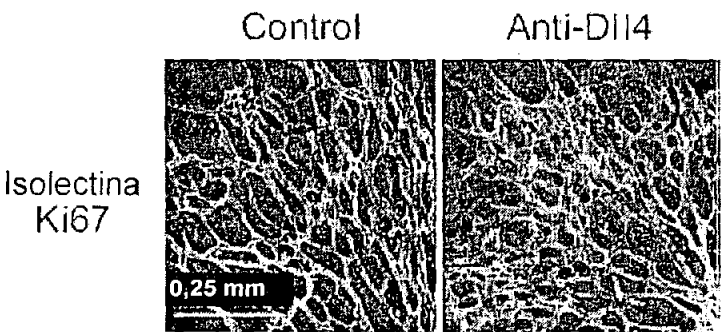


FIG. 1h

247

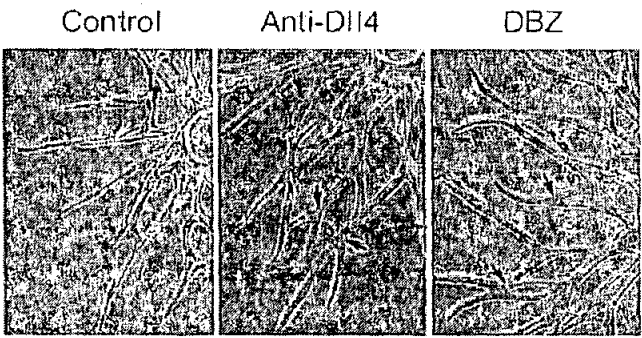


**FIG. 2a**

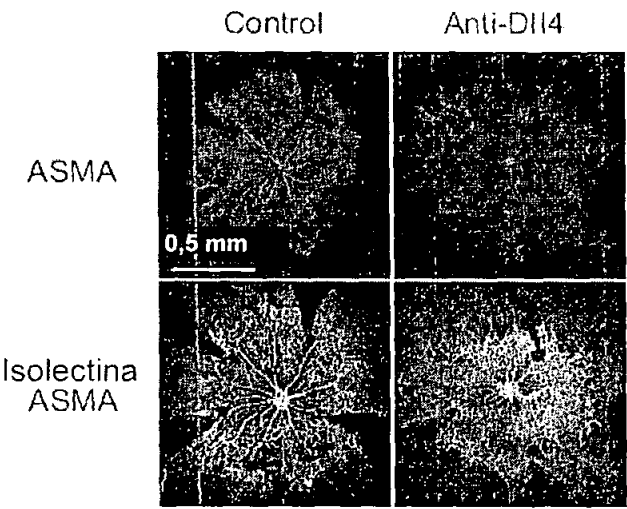


**FIG. 2c**

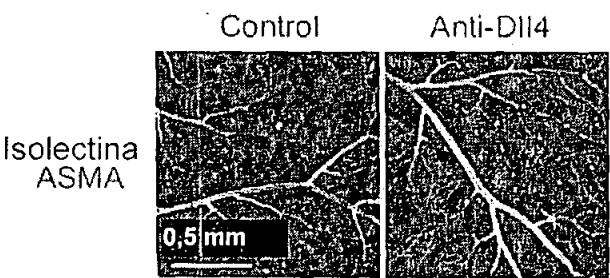


**FIG. 2d**

244

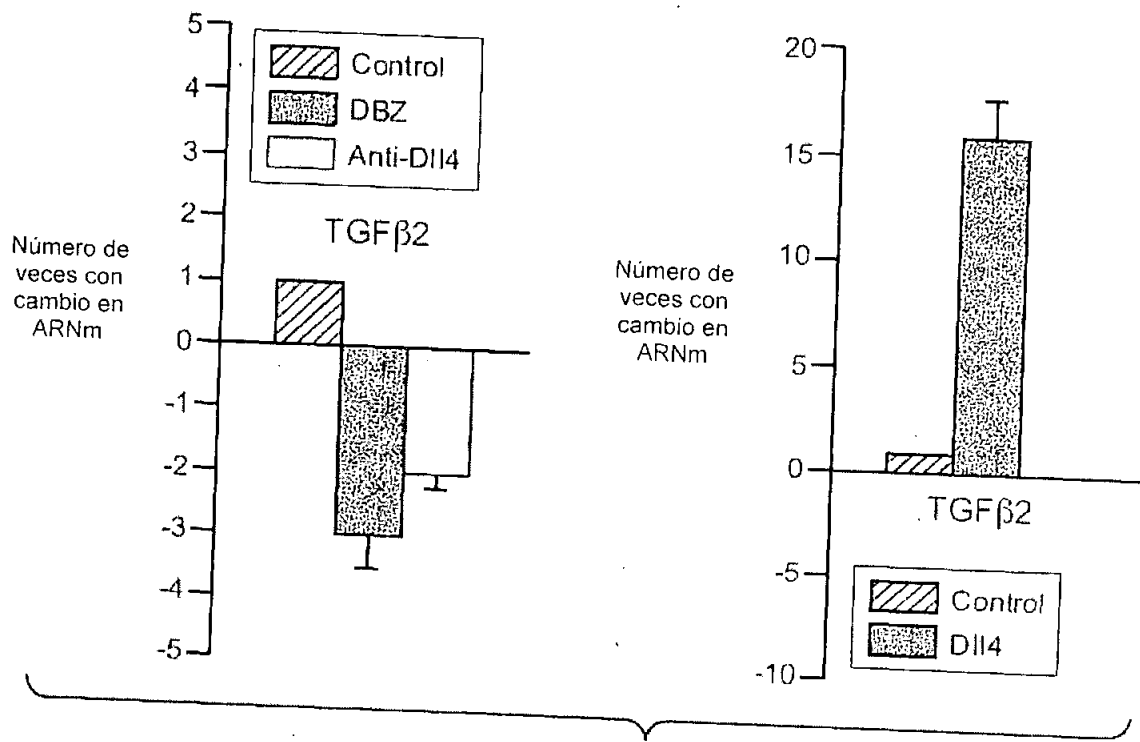
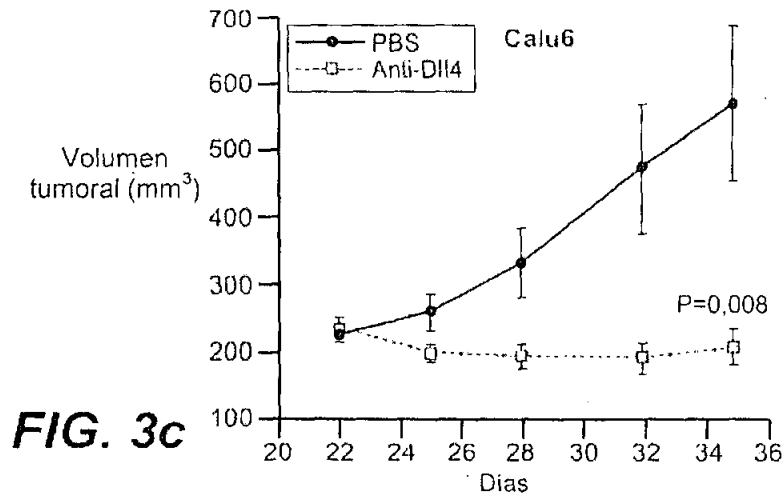
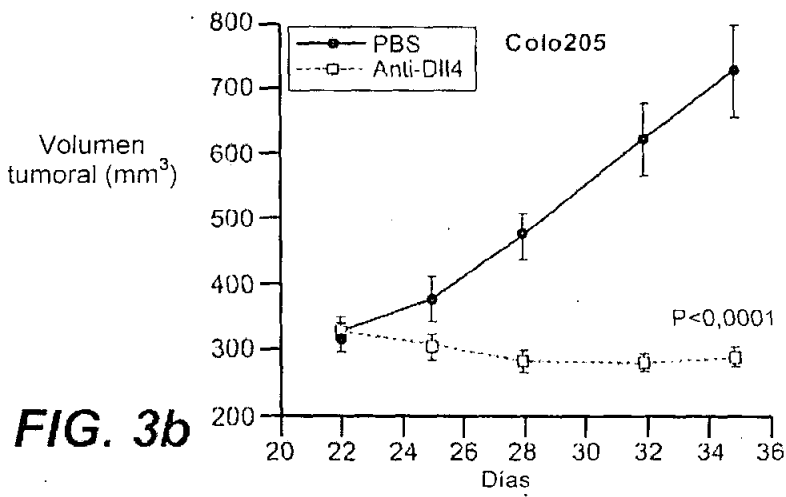
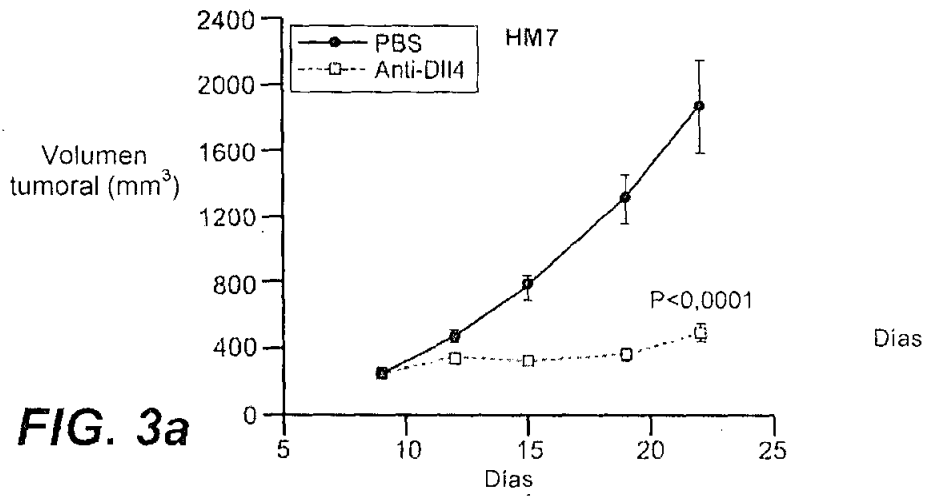


FIG. 2b

245



246

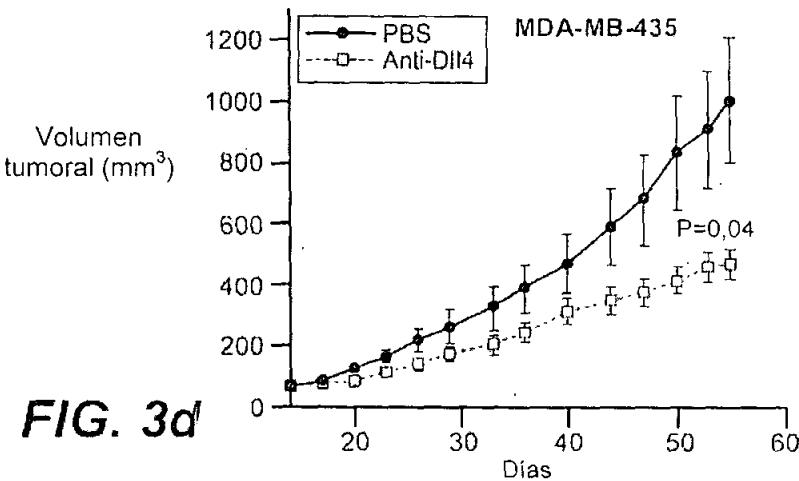


FIG. 3d

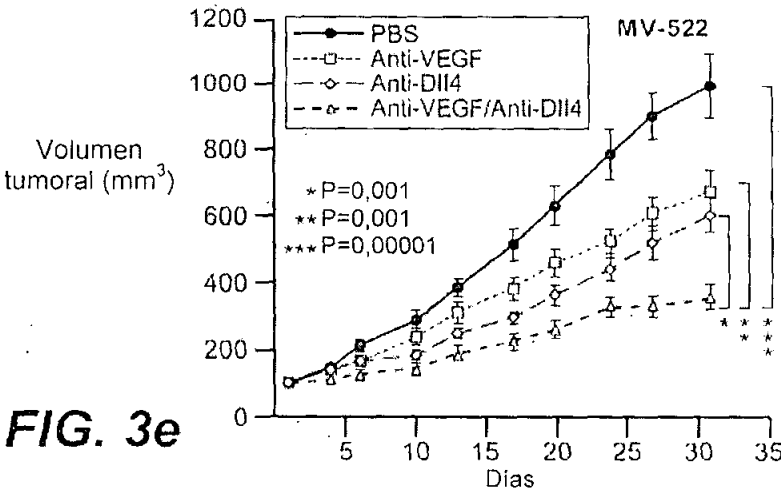


FIG. 3e

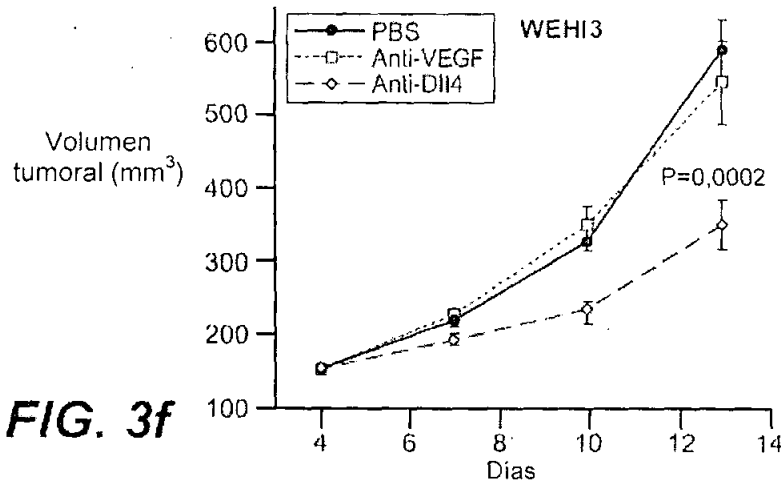


FIG. 3f

248

P2372R1

8 / 17

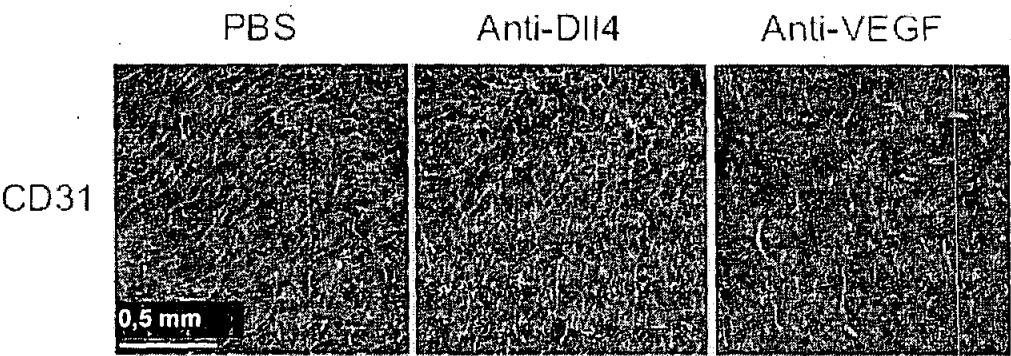


FIG. 3g

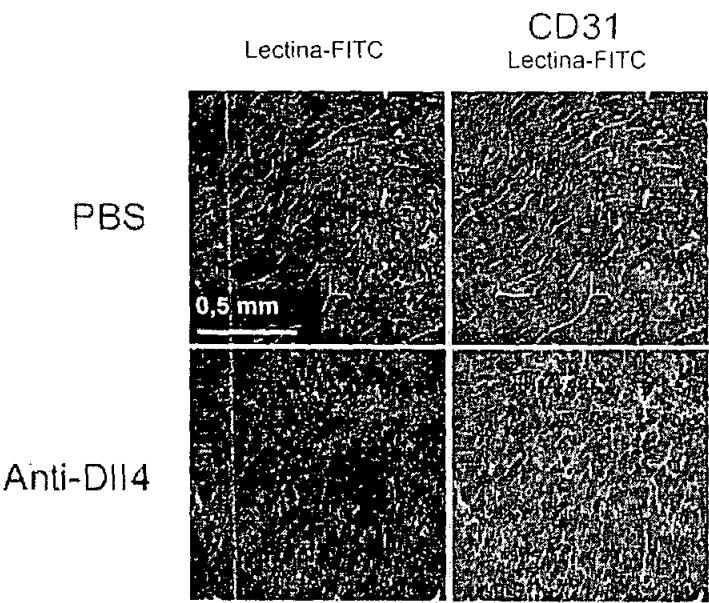
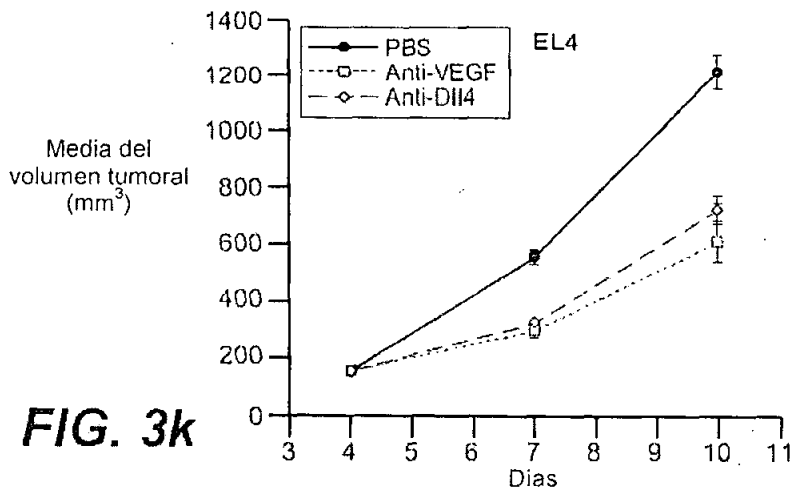
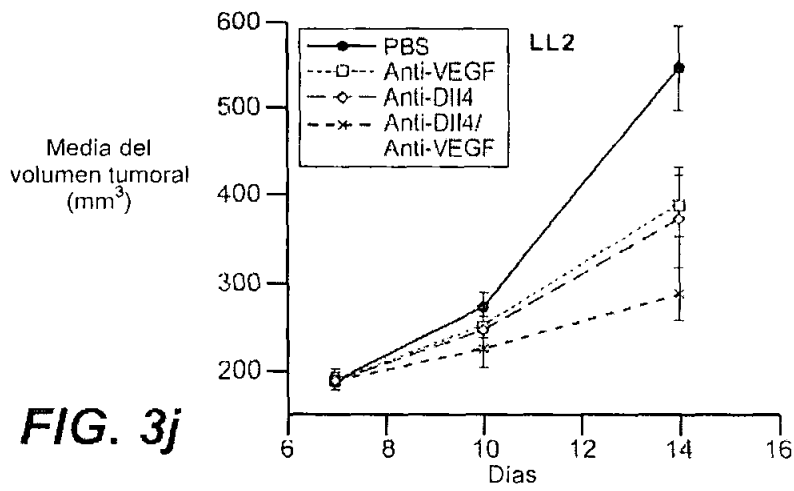
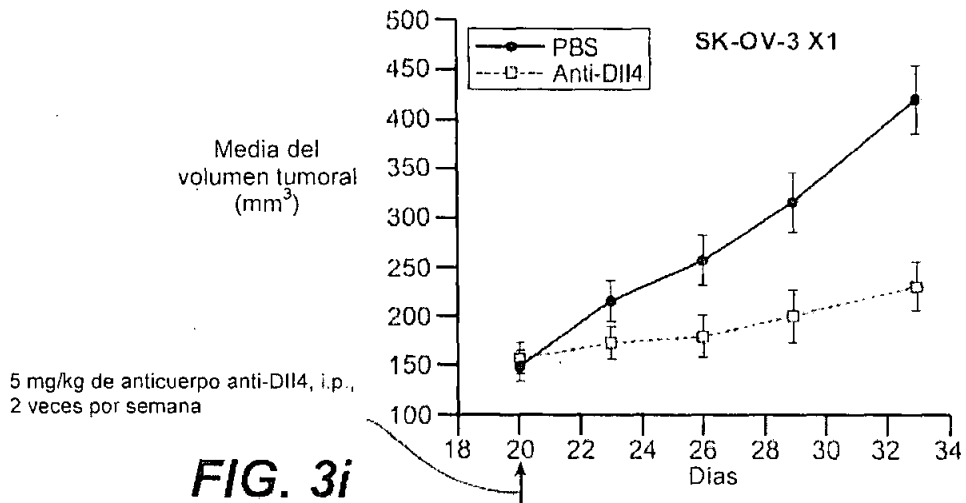


FIG. 3h

9/17



244

P2372R1

10 / 17

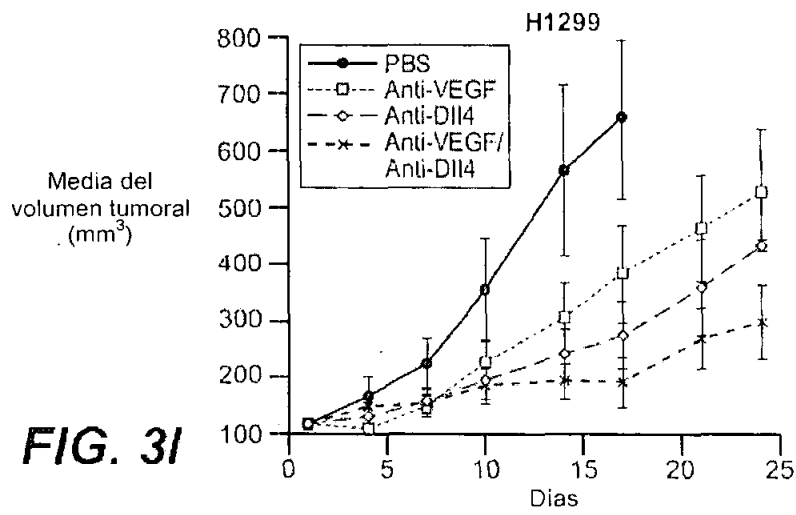


FIG. 3l

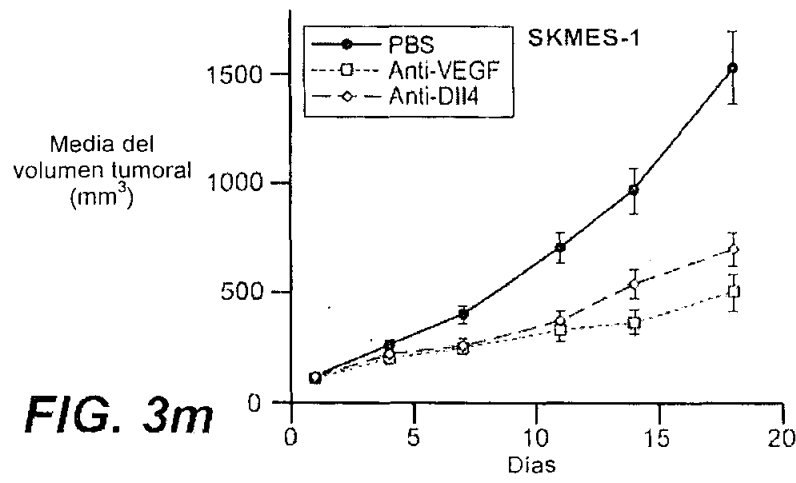


FIG. 3m

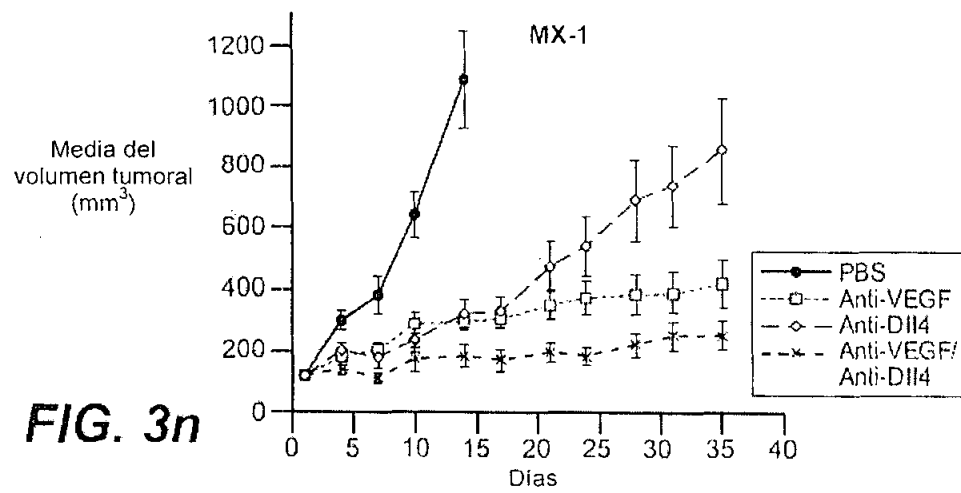


FIG. 3n



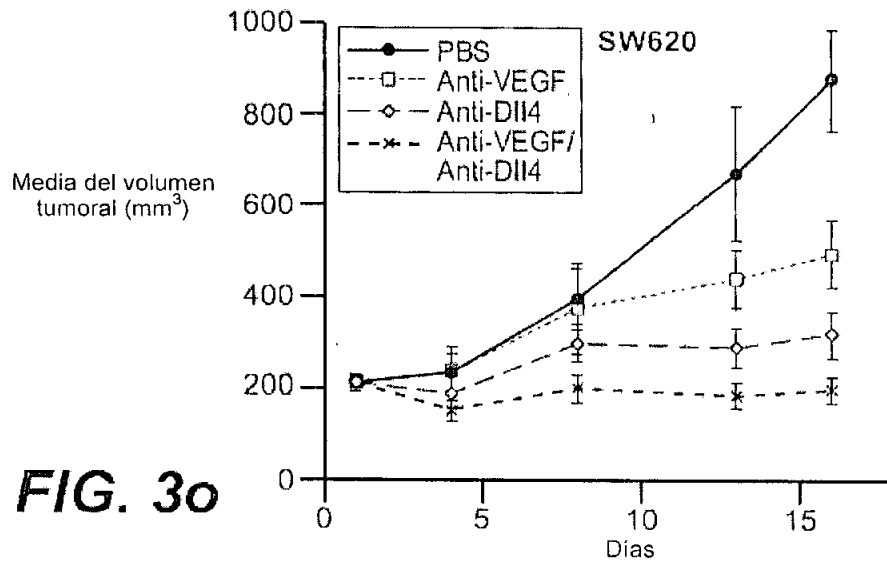


FIG. 3o

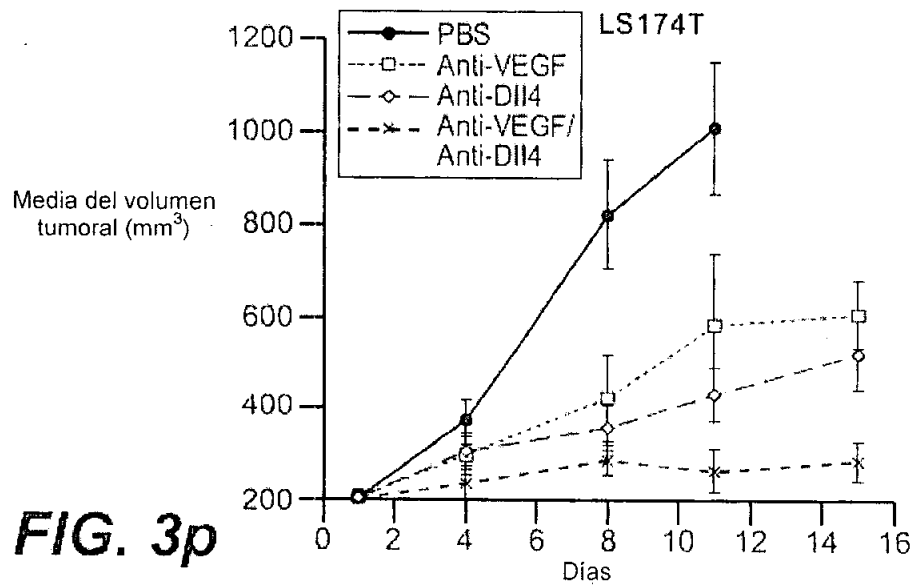


FIG. 3p

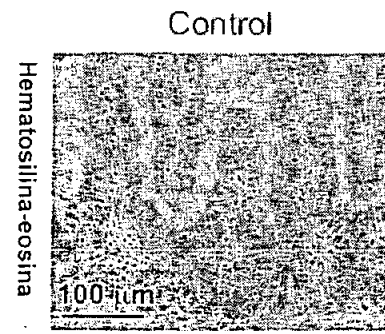


**FIG. 4a**

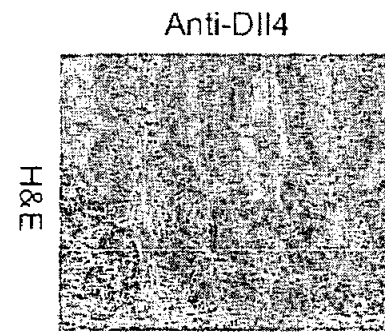


**FIG. 4b**

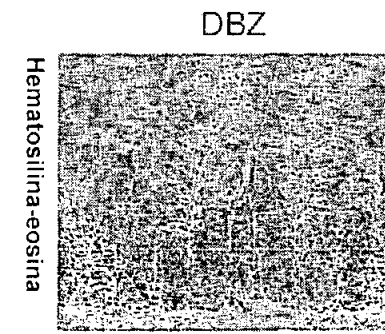


**FIG. 4c**

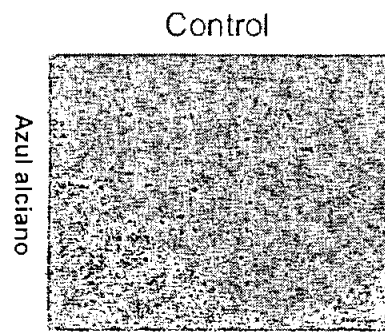


**FIG. 4d**

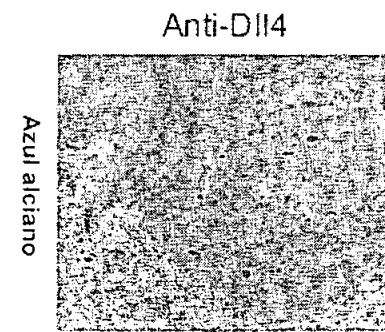


**FIG. 4e**

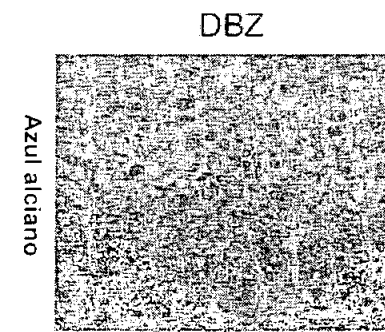


**FIG. 4f**

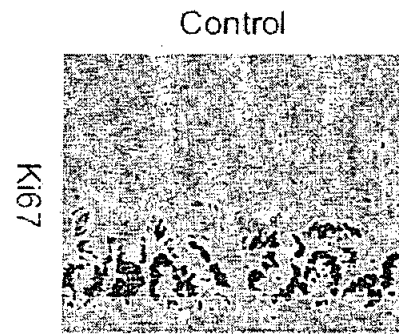


**FIG. 4g**

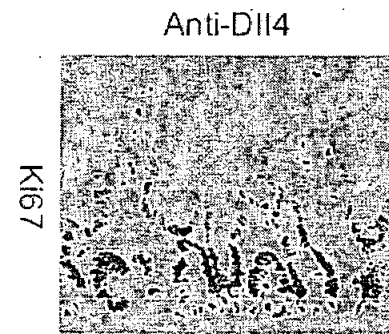


**FIG. 4h**

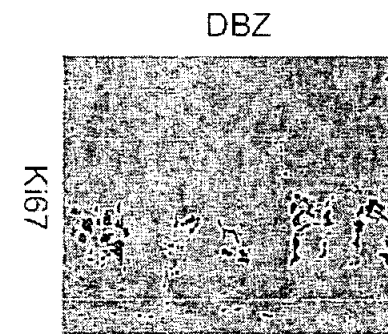


**FIG. 4i**

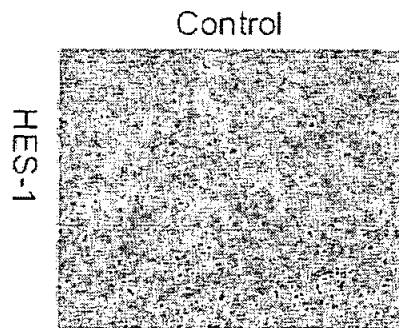


**FIG. 4j**

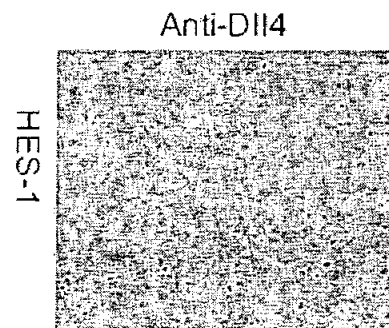


**FIG. 4k**

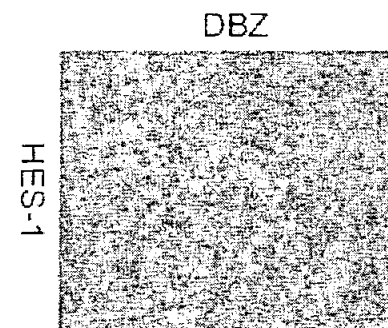


**FIG. 4l**

252

243

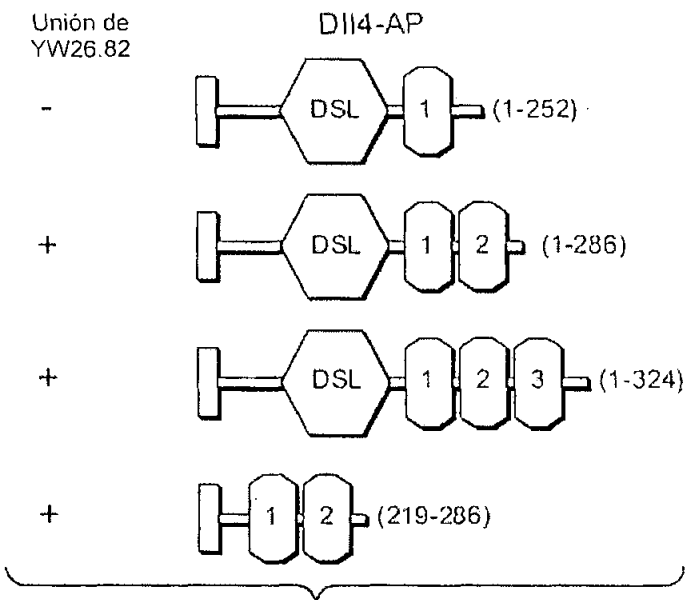


FIG. 5a

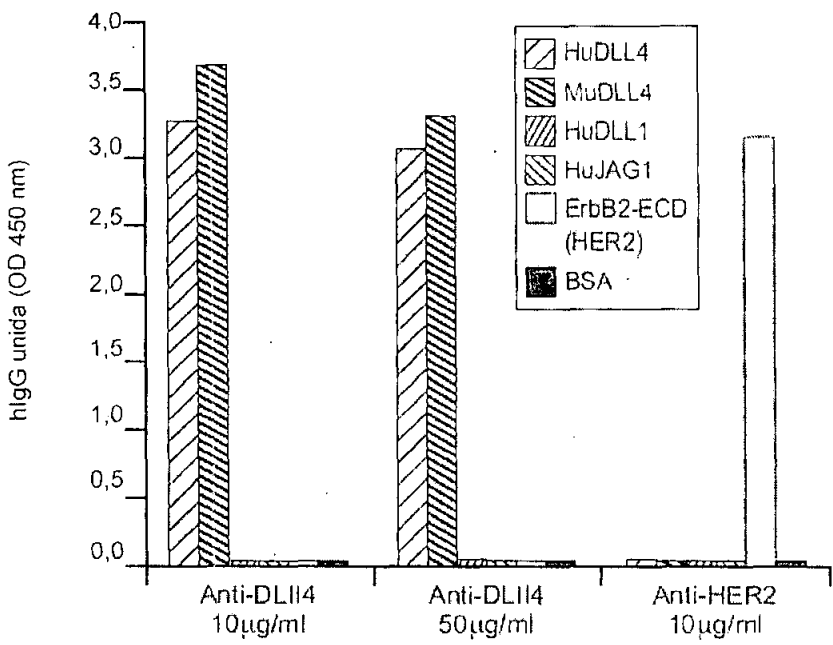


FIG. 5b

251

P2372R1

15 / 17

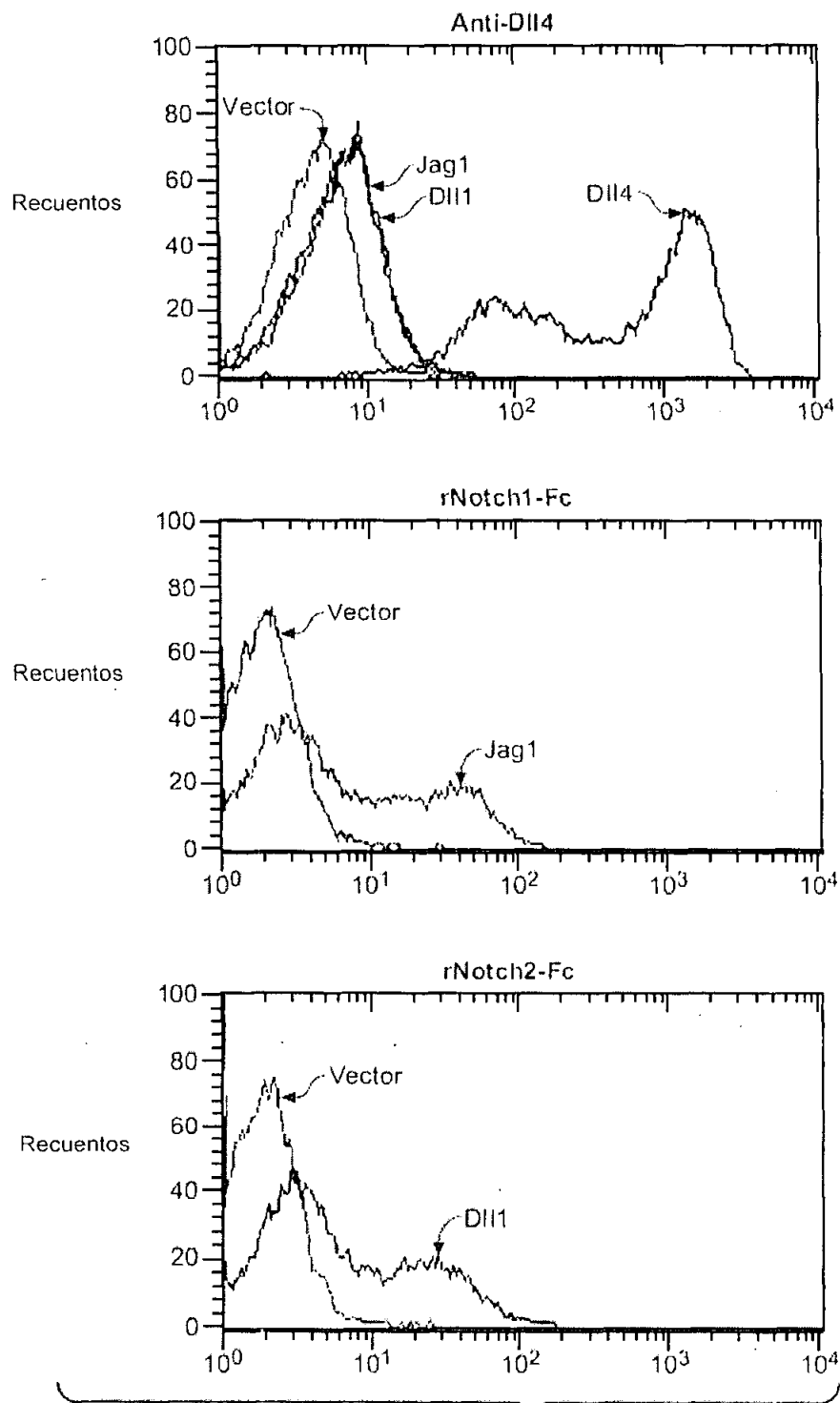


FIG. 5c

P2372R1

16 / 17

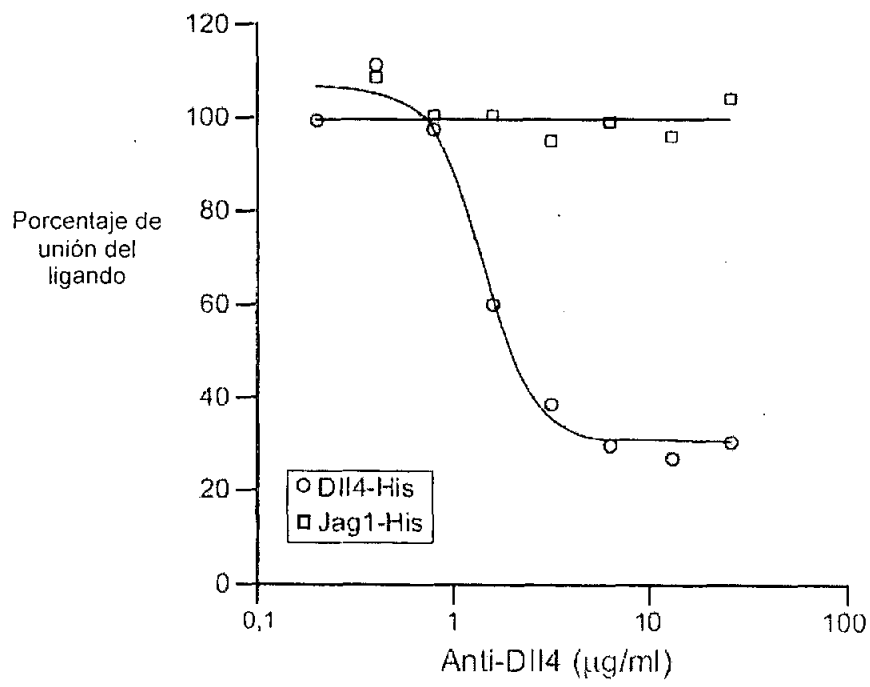
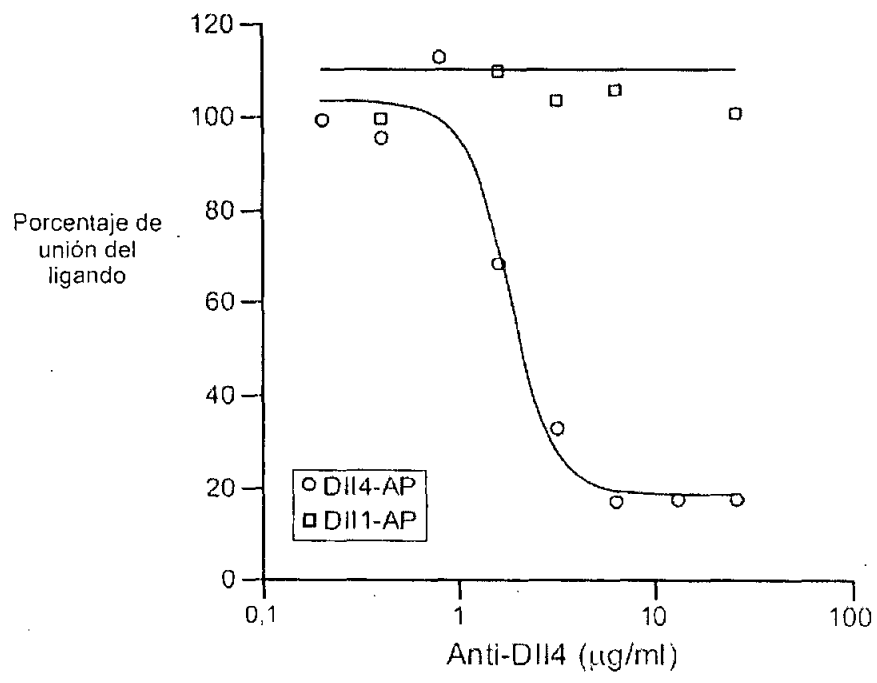


**FIG. 5d**

116

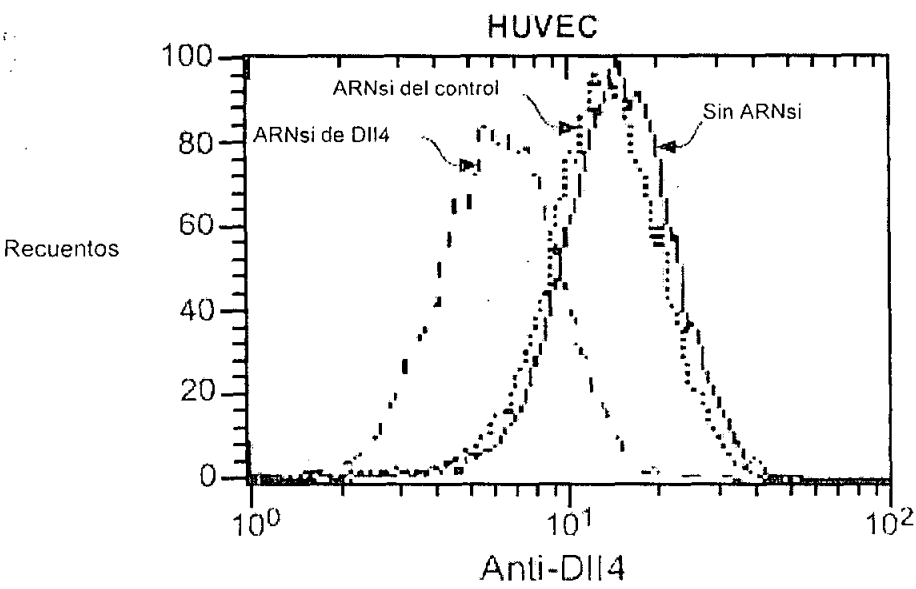


**FIG. 5e**

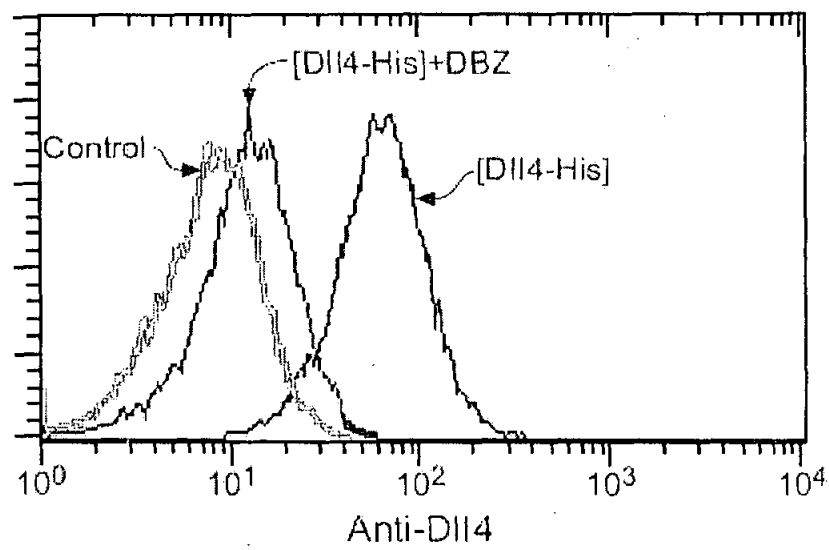


**FIG. 6**

<110> GENENTECH, INC.  
YAN, Minhong

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA MODULACIÓN DEL DESARROLLO VASCULAR

<130> P2372R1

<150> US 60/811,357

<151> 2006-06-06

<150> US 60/866.767

<151> 2006-11-21

<160> 21

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 1

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 Thr  
110 115

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 2

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



228

GENENLAW-#246262-v1-P2372R1--\_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 Thr Tyr Tyr Cys Gln  
80 85 90  
Gln Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
95 100 105  
Glu Ile Lys Arg

<210> 3  
<211> 6  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> secuencia sintetizada  
  
<220>  
<221> CAAT\_señal base\_modificada  
<222> 2  
<223> Caja CAAT  
  
<400> 3  
cncaat 6  
  
<210> 4  
<211> 6  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> secuencia sintetizada  
  
<220>  
<221> polyA\_señal  
<222> completo  
<223> señal de poliadenilación  
  
<400> 4  
aataaa 6  
  
<210> 5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN  
  
<400> 5  
caactgccct tatggctttt t 21

214

GENENLAW-#246262-v1-P2372R1\_-\_Spanish\_Translation\_of\_Sequence\_Listing

<210> 6  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN  
  
<400> 6  
aaagccataa gggcagttgt t 21  
  
<210> 7  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN  
  
<400> 7  
caactgccct tcaatttc t 21  
  
<210> 8  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN  
  
<400> 8  
tgaaattgaa gggcagttgt t 21  
  
<210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN  
  
<400> 9  
tgaccaagat ctcaactact t 21  
  
<210> 10  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN  
  
<400> 10  
gtagttgaga tcttggtcat t 21  
  
<210> 11  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> siARN

260

GENENLAW-#246262-v1-P2372R1\_-\_Spanish\_Translation\_of\_Sequence\_Listing

<400> 11  
ggccaactat gcttgtgaat t 21

<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> siRNA

<400> 12  
ttcacaagca tagttggcct t 21

<210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 13  
aagtcttgca aatgcagcta 20

<210> 14  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 14  
catcatcatt atcatcatca ttgtc 25

<210> 15  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sonda oligonucleotídica

<400> 15  
aattcttgga aaagtggcaa gaccaaaat 29

<210> 16  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido

<400> 16  
ctttcacca gcaggaagta g 21

<210> 17  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

261

GENENLAW-#246262-v1-P2372R1\_-\_Spanish\_Translation\_of\_Sequence\_Listing

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido  
  
<400> 17  
tgcagtccga ggtccttt 18  
  
<210> 18  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> sonda oligonucleotídica  
  
<400> 18  
cgcatTTgat tttcatttcg acaacaga 28  
  
<210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> cebador de oligonucleótido  
  
<400> 19  
gaagatggtg atgggatttc 20  
  
<210> 20  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> cebador de oligonucleótido  
  
<400> 20  
gaaggtgaag gtcggagtc 19  
  
<210> 21  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> sonda oligonucleotídica  
  
<400> 21  
caagcttccc gttctcagcc 20

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

76  
**PCT**

To:

GENENTECH, INC.  
Attn. Kalinowski, Grant  
1 DNA Way, MS-49  
South San Francisco, CA 94080  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND  
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL  
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

Calendared

30 Day US IDS  
P2372R1 - 11 JAN 08

**RECEIVED**

DEC 12 2007

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing  
(day/month/year)

06/12/2007

Applicant's or agent's file reference

GENENTECH, INC.  
LEGAL DEPT.

P2372R1 WO ✓

**FOR FURTHER ACTION**

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2007/07051

International filing date  
(day/month/year)

06/06/2007 ✓

Applicant

Resp. to ISR/Consid Ch 2 - 06 FEB 08

GENENTECH, INC.

Ch 2 Deadline / Resp to WO - 06 APR 08 - 22 mos.

**Due Date**

- 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

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 49. 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<br><b>P2372R1 WO</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, Item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/US2007/070516</b>  | International filing date (day/month/year)<br><b>06/06/2007</b>                                  | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>06/06/2006</b> |
| Applicant<br><b>GENENTECH, INC.</b>                        |                                                                                                  |                                                                |

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. 3e  
☒ as suggested by the applicant  
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention  
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2007/070516

## 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:



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2007/070516

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

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

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

## Remark on Protest

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

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2006134121                             | A1 | 22-06-2006          | NONE                       |                     |
| WO 2007070671                             | A  | 21-06-2007          | NONE                       |                     |

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. A61K38/17 A61K39/395

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)  
 A61K

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         | <p>NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dl14) is critical for tumor growth and angiogenesis."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721</p> <p>&amp; 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006</p> <p>ISSN: 0197-016X</p> <p>abstract</p> | 1-5,<br>10-25         |

☒ 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.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 November 2007

Date of mailing of the international search report

06/12/2007

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

Kania, Thomas

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| X | <p>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<br/>ISSN: 0008-5472<br/>the whole document</p> | 6 |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

|   |                                                                                                                                                                                                   |  |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| A | <p>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<br/>ISSN: 0962-8924</p> |  |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|   |                                                                                                                                                                                                                                       |  |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| A | <p>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<br/>ISSN: 0006-4971</p> |  |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| A | <p>TAVARES MARIA J ET AL: "Inhibition of vascular endothelium by the Notch-ligand delta-4 unveils a novel therapeutic target." BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 531a, XP009091788<br/>&amp; 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003<br/>ISSN: 0006-4971</p> |  |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| A | <p>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<br/>ISSN: 0028-0836</p> |  |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

-/--

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No.        |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| A         | CLAXTON S ET AL: "Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries" GENE EXPRESSION PATTERNS, ELSEVIER, vol. 5, no. 1, November 2004 (2004-11), pages 123-127, XP004631657 ISSN: 1567-133X cited in the application                                                                          | 5,19                         |
| P,X       | 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 the whole document                                                                | 1-4,6-9, 20-25               |
| P,X       | 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 the whole document                                                                       | 1-4, 6-18, 20-25             |
| 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 | 1-9, 20-25                   |
| P,X       | US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22) the whole document                                                                                                                                                                                                                  | 1-4,7,8, 10-14, 16-18, 20-25 |
| 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                                                                                                                                                                      | 1-4, 9-15,17, 18,20-25       |

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| T         | <p>SAINSON R C A ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?"</p> <p>TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE 2007 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 9, 2007, pages 389-395, XP002457727</p> <p>ISSN: 1471-4914</p> <p>-----</p>           |                       |
| T         | <p>THURSTON G ET AL: "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth"</p> <p>NATURE REVIEWS CANCER 2007 UNITED KINGDOM, vol. 7, no. 5, 2007, pages 327-331, XP002457728</p> <p>ISSN: 1474-175X 1474-1768</p> <p>-----</p> |                       |

PCT 212 ✓

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.<br>PCT/US2007/070516 | International filing date (day/month/year)<br>06.06.2007 | Priority date (day/month/year)<br>06.06.2006 |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. A61K38/17 A61K39/395

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.

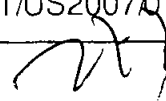
For further options, see Form PCT/ISA/220.

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

|                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                      |                                                                               |                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA:<br><br>European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Date of completion of<br>this opinion<br><br>see form<br>PCT/ISA/210 | Authorized Officer<br><br>Kania, Thomas<br><br>Telephone No. +49 89 2399-7703 |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/US2007/070516



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. 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.
3. ☐ 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.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

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



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

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

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-25 partially

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-25 partially relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

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

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

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

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

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

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

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

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**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**

1. Statement

|                               |             |                    |
|-------------------------------|-------------|--------------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | <u>2,5-25</u>      |
|                               | No: Claims  | <u>1,3,4</u>       |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | <u>7-9</u>         |
|                               | No: Claims  | <u>2,5,6,10-25</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims |                    |
|                               | No: Claims  |                    |

2. Citations and explanations

see separate sheet

**Box No. VI Certain documents cited**

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

The present written opinion refers to the following documents cited in the search report:

- D1: 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, & 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006 ISSN: 0197-016X
- D2: 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, ISSN: 0008-5472
- D3: 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, ISSN: 0962-8924
- D4: CLAXTON S ET AL: "Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries" GENE EXPRESSION PATTERNS, ELSEVIER, vol. 5, no. 1, November 2004 (2004-11), pages 123-127, ISSN: 1567-133X cited in the application
- D5: 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, ISSN: 0028-0836
- D6: 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, ISSN: 0028-0836
- D7: 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, ISSN: 0027-8424
- D8: US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22)
- D9: WO 2007/070671 A (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21)

#### **Subject-matter of the application**

The application relates to the use of DLL4-antagonists (e.g. antibodies) in the treatment of cell proliferative disorders, e.g. cancer, inhibition of angiogenesis by inhibition of endothelial cell differentiation. DLL4 binds the notch receptor and is involved in notch signalling.

**Re Item III: No opinion on industrial applicability**

Claims 1-25 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 67.1(iv) PCT**. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (**Article 34(4)(a)(I) PCT**).

**Re Item V: Novelty, Inventive step, Industrial applicability**

1. For the assessment of the present claims 1-25 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
2. Present claims 1, 3, and 4 appear to lack novelty in the light of D1 (**Article 33(2) PCT**)  
D1 discloses the use of a DLL4 antagonist (DLL4-Fc) in tumors, which leads to reduced tumor growth, more highly branched tumor vessels, and networks with dense vascular sprouting.
3. The subject-matter of claim 17 has not explicitly been disclosed in the prior art. In the light of the well-known interaction of DLL4 and other pro-angiogenic factors, e.g. VEGF (see e.g. D3, page 296/297, bridging paragraph), it has to be considered as obvious to combine such factors to enhance the desired effect (**Article 33(3) PCT**).  
  
Further, the subject-matter of dependent claims 2, 5, 10-16, 20-25 does not appear to be inventive in the light of general knowledge in the art and the cited disclosures D3 and D4 (**Article 33(3) PCT**).
4. The subject-matter of present claim 6 appears to lack an inventive step in the light of D2 (**Article 33(3) PCT**). D2 discloses the knockdown of endogenous DLL4 expression levels by RNAi in endothelial cells. This leads to reduced endothelial cell

proliferation, migration, and network formation.

It can thus be assumed that the skilled person wishing to stimulate endothelial cell proliferation would increase the level of DLL4 expression using either overexpression of DLL4 or a DLL4 agonist as done in claim 6.

5. The subject-matter of claims 7-9 appears to be novel and inventive in the light of the cited prior art.

**Re Item VI: Certain documents cited**

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" and "E"-documents cited in the search report (D5-D9) may have to be considered for novelty and/or inventive step in addition to the document cited above.

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 | <p>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).</p> <p>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).</p> |
| 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

270

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.

From the INTERNATIONAL BUREAU

## PCT

NOTIFICATION 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)<br>29 August 2007 (29.08.2007)      |                                                                         |
| Applicant's or agent's file reference<br>P2372R1 WO                  | IMPORTANT NOTIFICATION                                                  |
| International application No.<br>PCT/US2007/070516                   | International filing date (day/month/year)<br>06 June 2007 (06.06.2007) |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>06 June 2006 (06.06.2006)             |
| Applicant<br>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<br>or PCT receiving Office | Date of receipt<br>of priority document |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 06 June 2006 (06.06.2006)     | 60/811,357               | US                                                    | 21 August 2007 (21.08.2007)             |
| 21 November 2006 (21.11.2006) | 60/866,767               | US                                                    | 21 August 2007 (21.08.2007)             |

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Athina Nickitas-Etienne

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Telephone No. +41 22 338 74 04



## 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]<br>Version 3.51.018.193 MT/FOP<br>20070401/0.20.5.9          |
| 0-5     | Petition<br>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                                                                                                   | P2372R1 WO                                                                        |
| I       | Title of invention                                                                                                                      | COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT                      |
| 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<br>South San Francisco, California 94080<br>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<br>Foster City, California 94404<br>United States of America |
| III-1-6 | State of nationality                                                                                                                    | US                                                                                |
| III-1-7 | State of residence                                                                                                                      | US                                                                                |

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IV-1   | Agent or common representative; or address for correspondence<br>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.<br>1 DNA Way, MS-49<br>South San Francisco, California 94080<br>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);<br>ANDRUS, Alex (44,509); BARNES, Elizabeth M. (35,059); COBURN, Cara M. (46,631);<br>BARRY, Anna L. (51,436);<br>CONLEY, Deirdre (36,487); CUI, Steven X. (44,637); ELLIOTT, Jennifer (50,584);<br>EVANS, David (41,430); HASAK, Janet E. (28,616); JOHNSTON, Sean A. (35,910);<br>KRESNAK, Mark T. (42,767); KUBINEC, Jeffrey S. (36,575); LEE, Wendy M. (40,378);<br>MARSCHANG, Diane L. (35,600);<br>NAIK, Paul (49,075);<br>PASQUALONE, Danielle (43,847);<br>PLEASURE, Irene (45,506); SCHWARTZ, Timothy R. (32,171); SHERMAN, Daniel (53,586);<br>SHIN, Elinor K. (43,117); SVOBODA, Craig G. (39,044); TAN, Lee K. (39,447);<br>YEUNG, Bonnie (53,811); WANG, Min (51,303) |
| 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. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                       |  |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--|
| VI-1   | Priority claim of earlier national application                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                       |  |
| VI-1-1 | Filing date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 06 June 2006 (06.06.2006)             |  |
| VI-1-2 | Number                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 60/811,357                            |  |
| VI-1-3 | Country                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US                                    |  |
| VI-2   | Priority claim of earlier national application                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                       |  |
| VI-2-1 | Filing date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 21 November 2006 (21.11.2006)         |  |
| VI-2-2 | Number                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 60/866,767                            |  |
| VI-2-3 | Country                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US                                    |  |
| VI-3   | Priority document request<br>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-4   | Incorporation by reference :<br>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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -                                     |  |

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION )

| IX                | Check list                                                                                                                       | number of sheets                    | electronic file(s) attached |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| IX-1              | Request (including declaration sheets)                                                                                           | 5                                   | ✓                           |
| IX-2              | Description (excluding sequence listing part)                                                                                    | 105                                 | -                           |
| IX-3              | Claims                                                                                                                           | 3                                   | -                           |
| IX-4              | Abstract                                                                                                                         | 1                                   | ✓                           |
| IX-5              | Drawings                                                                                                                         | 17                                  | -                           |
| IX-7a             | Sub-total number of sheets                                                                                                       | 131                                 |                             |
| IX-6a             | Sequence listing part of description                                                                                             | 0                                   | -                           |
| IX-7              | TOTAL                                                                                                                            | 131                                 |                             |
|                   | <b>Accompanying items</b>                                                                                                        | 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)<br>- (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                                                                       | 3e                                  |                             |
| 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                                                                                                                         |                                     |                             |

258

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION )

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  
PATENT NUMBER:  
TITLE: COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING VASCULAR DEVELOPMENT

FILING DATE: 06/06/2006  
ISSUE DATE:

## PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1  
Worksheet 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: | 80811357 |

## 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.

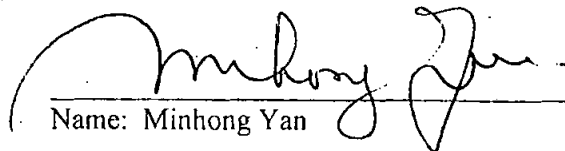
IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

South San Francisco:

Date

6-30-2006

Name: Minhong Yan







720

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\*

GRANT KALINOWSKI

1 DNA WAY

MS-49

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

\*500195621A\*

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

2.11

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: 650 467 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

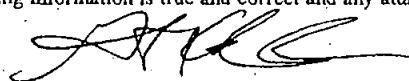
9. Statement and signature.

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

# State of California

## SECRETARY OF STATE

### APOSTILLE

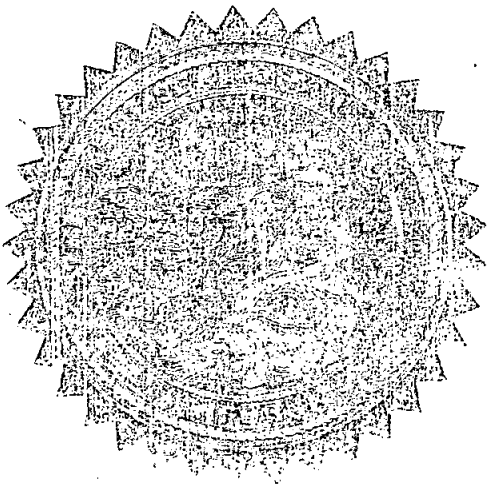
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

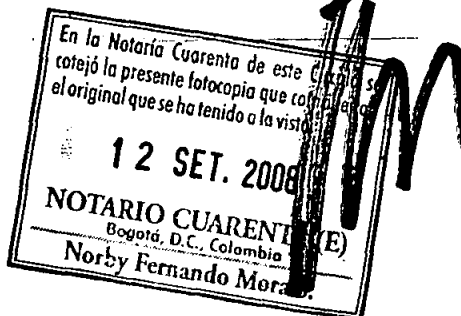
### CERTIFIED

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



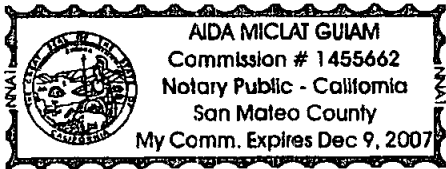
Secretary of State



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California }  
County of San Mateo } ss.  
On December 6, 2005 before me, Aida Mielat Guiam  
Date 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 Mielat 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.

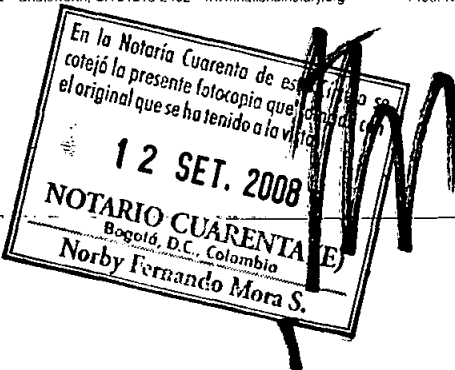
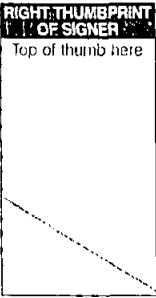
Description of Attached Document

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: \_\_\_\_\_



# Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

## PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

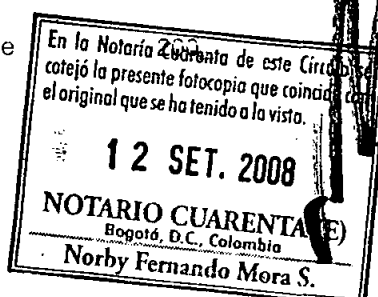
Otorgado y firmado en

hoy de

Firma

Nombre

Cargo



## POWER OF ATTORNEY

I (We)

**Genentech, Inc.**

**1 DNA Way**

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

Signature

Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**

Title **Section Patent Counsel**

**Authorized Corporate Signatory**

**Genentech, Inc.**



Zan

## AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

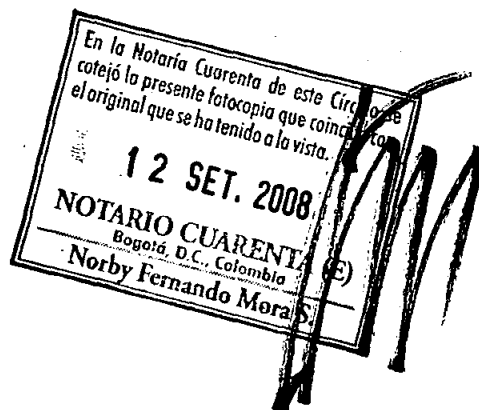
August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property  
Genentech, Inc.



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

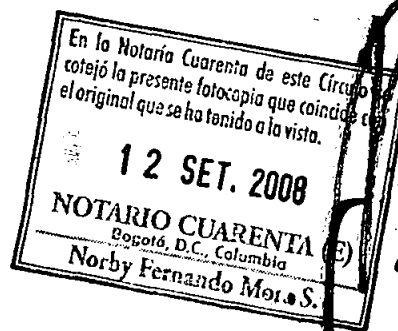
CERTIFICADO

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



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California )  
 ) ss.  
Condado de San Mateo )

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente  
Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a  
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo  
nombre esta suscrito en el instrumento y  
quien reconoció ante mi que ejecutó el  
mismo en su capacidad autorizada, y que  
por su firma en el instrumento la persona o  
la entidad a nombre de la cual la persona  
actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:  
AIDA MICLAT GUIAM  
COMISIÓN # 14556612  
Notario Público-California  
Condado de San Mateo  
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-----OPCIONAL-----

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede  
prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: \_\_\_\_\_

Fecha del Documento: \_\_\_\_\_ Número de páginas: \_\_\_\_\_

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: \_\_\_\_\_

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: \_\_\_\_\_

- ☐ Individuo  
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): \_\_\_\_\_  
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General  
☐ Abogado de hecho  
☐ Fideicomisario  
☐ Guardián o conservador  
☐ Otro: \_\_\_\_\_

El firmante representa: \_\_\_\_\_

|                                       |
|---------------------------------------|
| Huella Índice<br>derecho del firmante |
| Parte alta del dedo aquí              |

En la Notaría Cuarenta de este Circulo  
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.

301

## 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

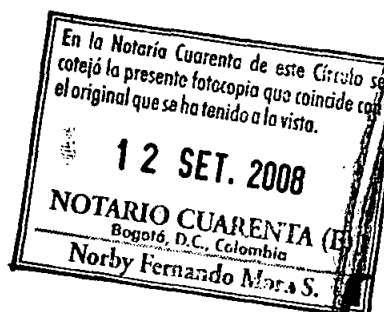
Fechado

(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

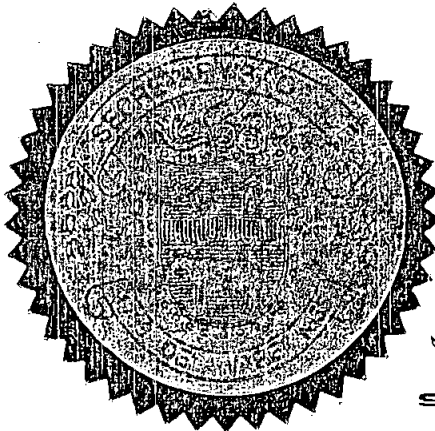
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

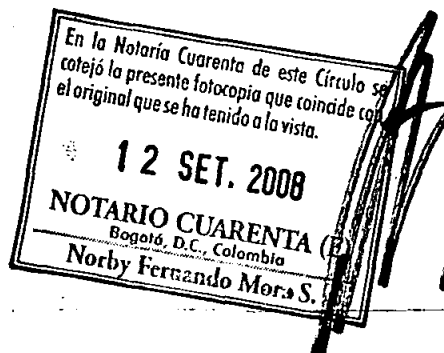
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

*Harriet Smith Windsor*

Secretary of State

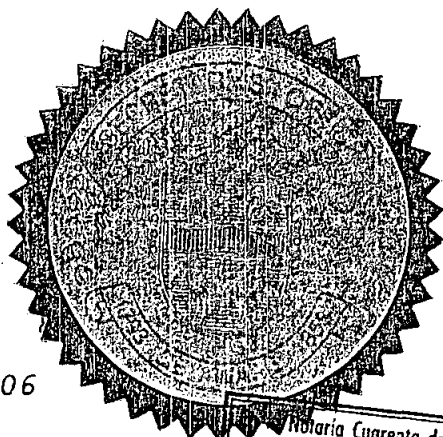


# Delaware

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

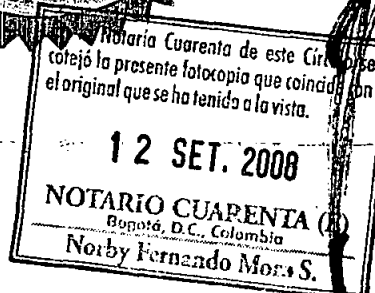
050426506

*Harriet Smith Windsor*

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05



304

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.

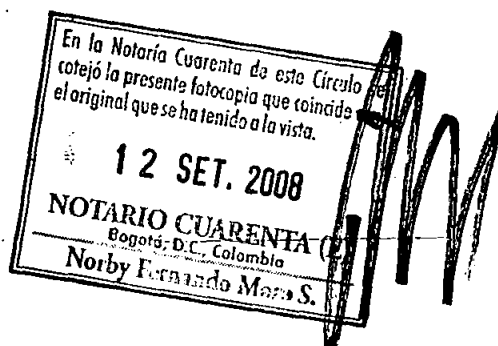
ARTICLE 2

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



30

## 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.

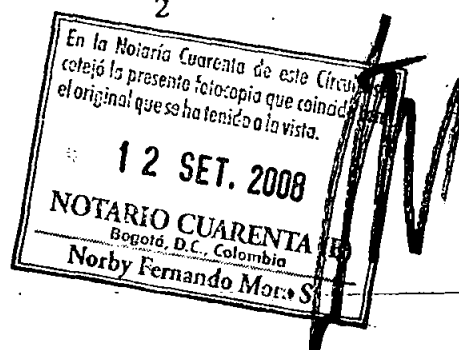
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the 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





204

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;

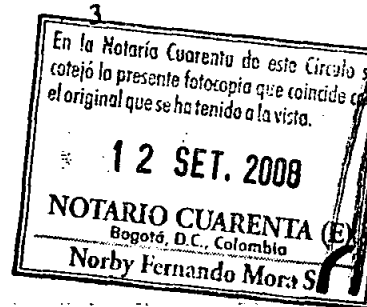
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(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.



207

## 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.

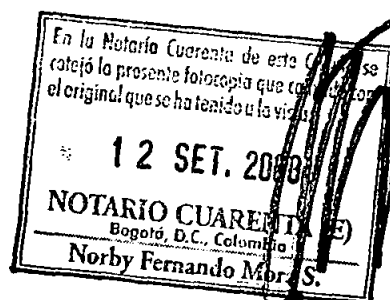
(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

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

4



30 8

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.

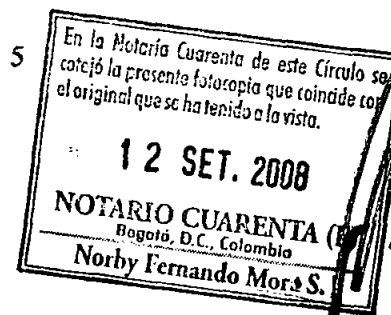
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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



239

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.

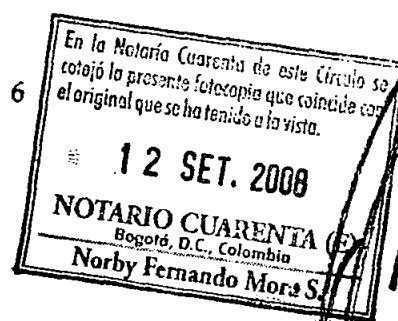
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect 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



30

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

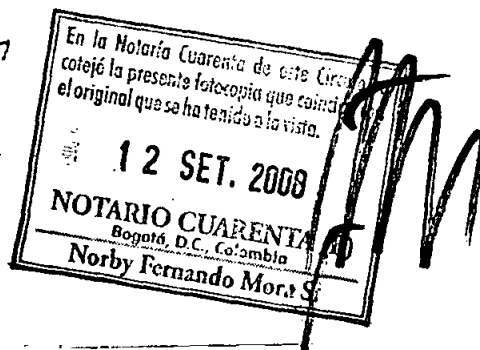
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(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.



311

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.

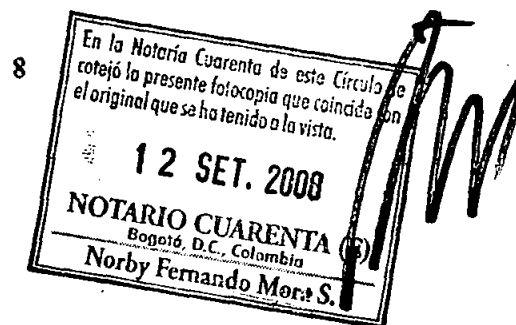
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or 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



31 ✓  
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.

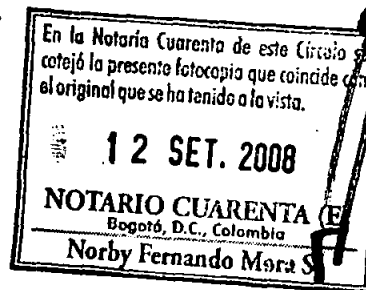
SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, 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

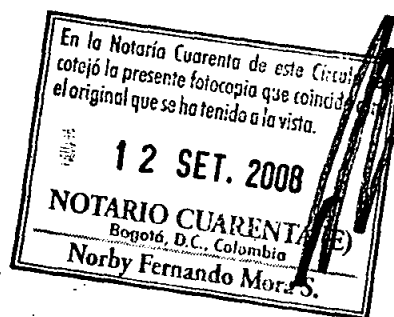


317

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.

10





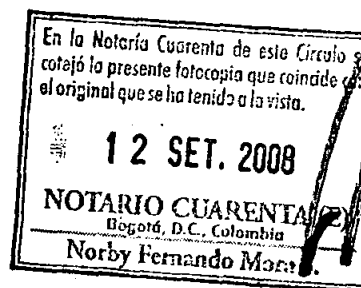
314

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

11



31)

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

---

APOSTILLA

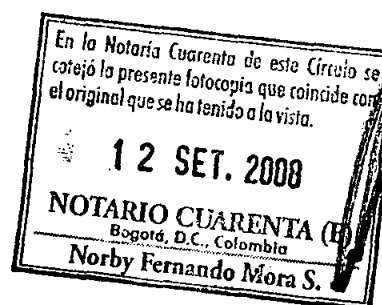
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

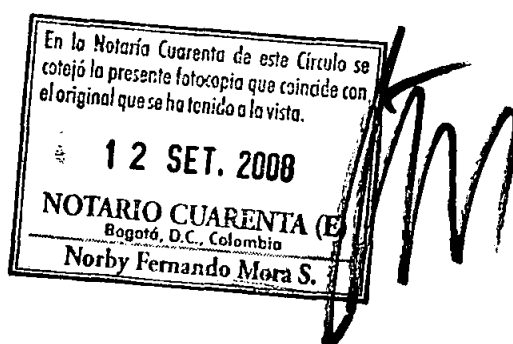
Harriet Smith Windsor (Firma)  
Secretaria de Estado



316

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

317

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

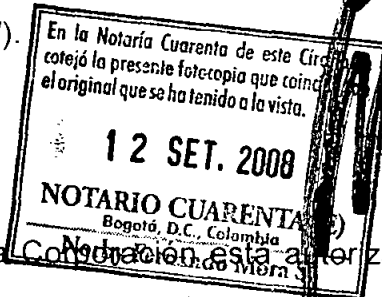
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a 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 esta 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 cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



716  
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.

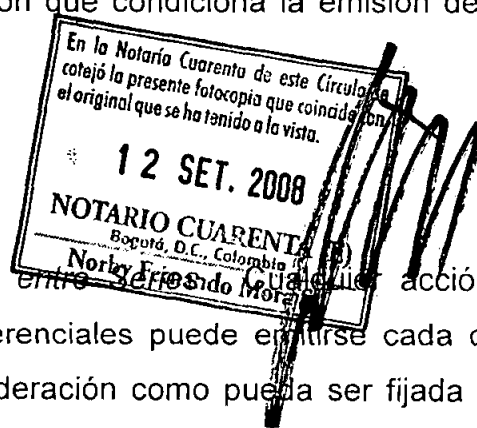
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de 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 del 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 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



314

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;

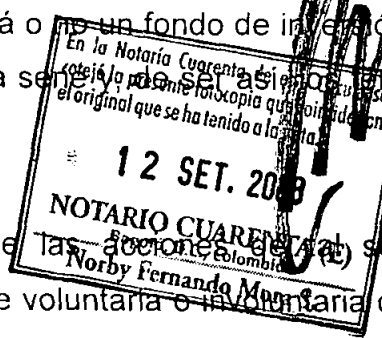
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(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 bajo diferentes 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



320

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.

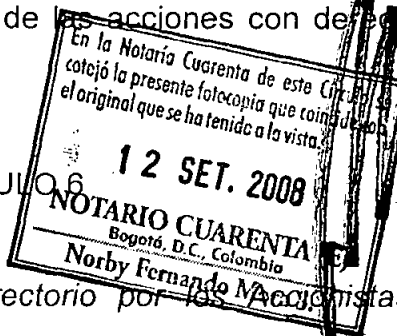
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(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



321

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

En la Notaría por Violación del deber fiduciario, presente fotocopia que coincida con el original que se exhiba a la vista.  
12 SET. 2008  
NOTARIO ADMINISTRADOR DE TAL PERSONA  
NORBY FERNANDEZ S.  
Bogotá, D.C., Colombia



32

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 con 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.

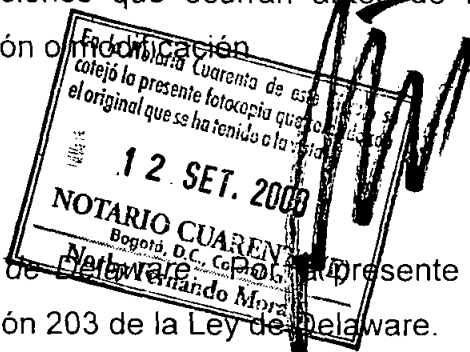
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, 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. La Corporación presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



343

ARTICULO 8

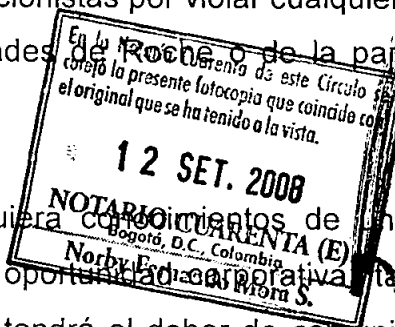
SECCION 8.01. *Relación con Roche*. Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define 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 artículo 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 adquiera 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



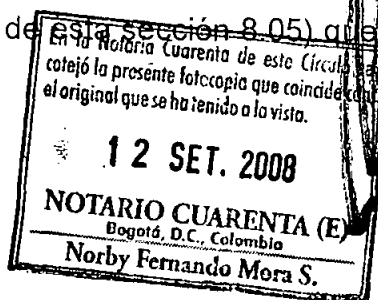
324

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



328

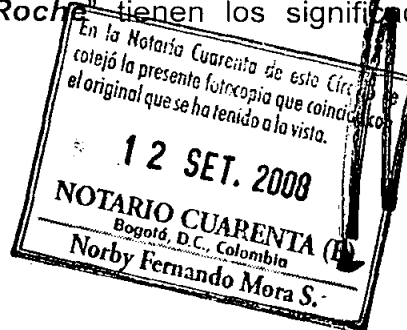
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

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 Certificado 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.



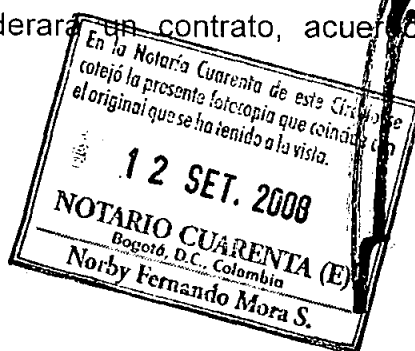
304

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.



328

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.

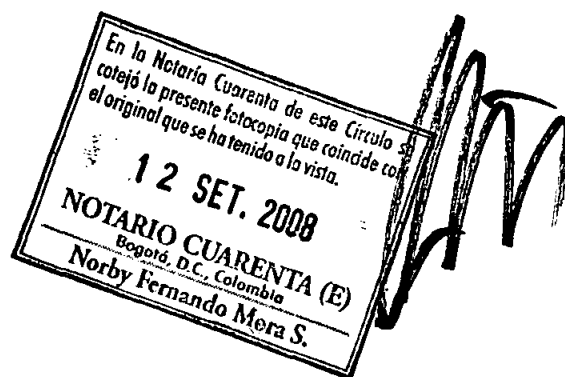
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



328

# 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

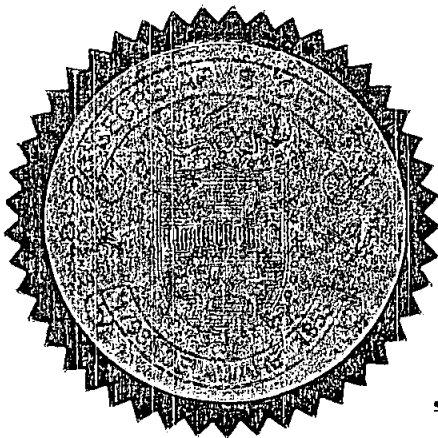
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

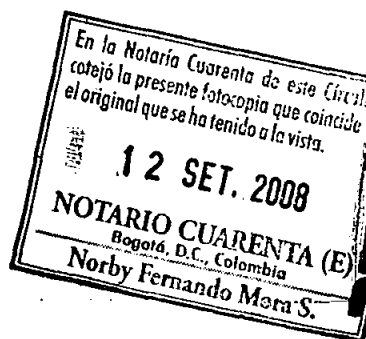
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

*Harriet Smith Windsor*

Secretary of State

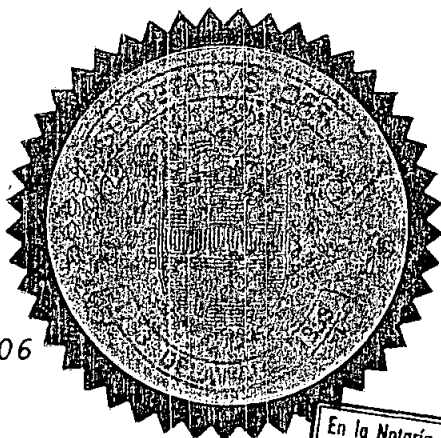


# Delaware

329  
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.



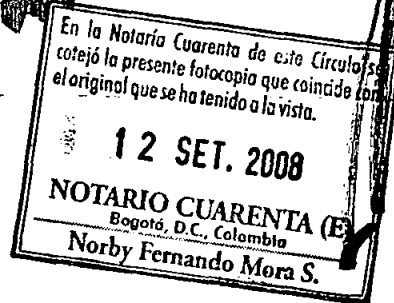
2112549

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.

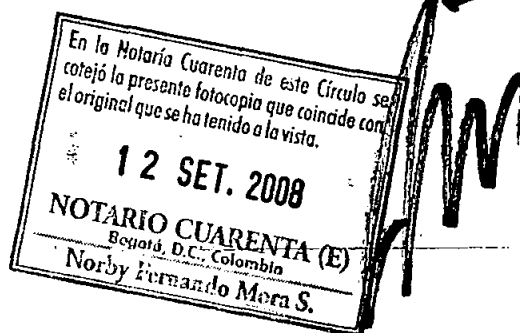
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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



APOSTILLA

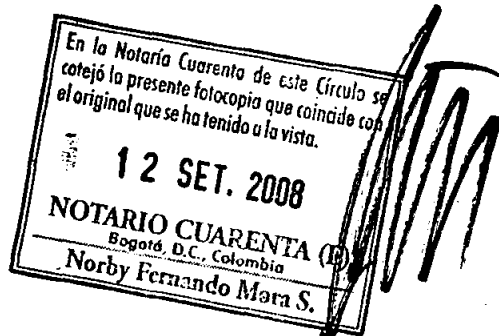
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

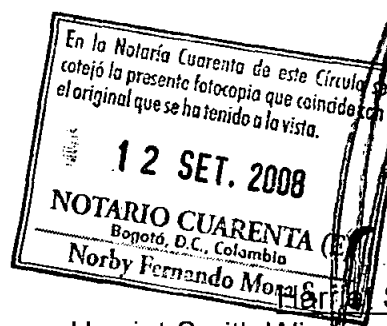
Harriet Smith Windsor (Firma)  
Secretaria de Estado



332 ✓

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

337

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.

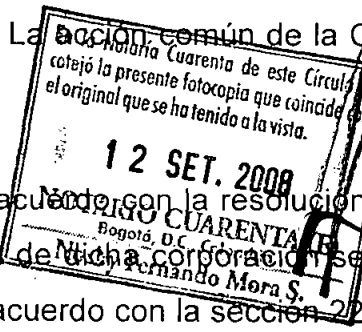
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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.



394

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

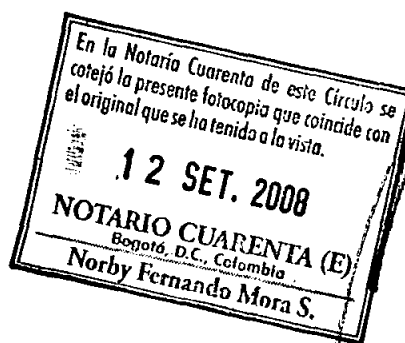
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo  
y Secretaría General.



335

# 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

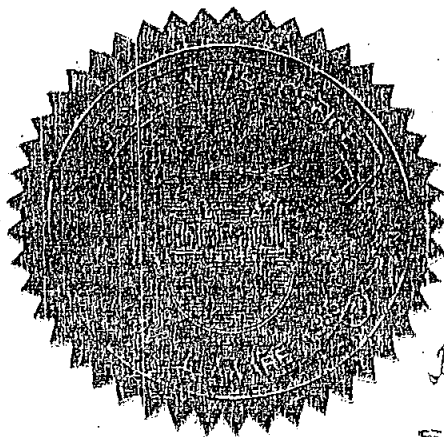
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D.: 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

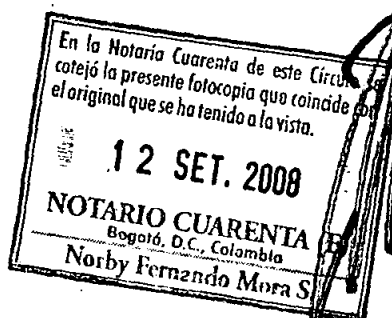
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

*Harriet Smith Windsor*

Secretary of State

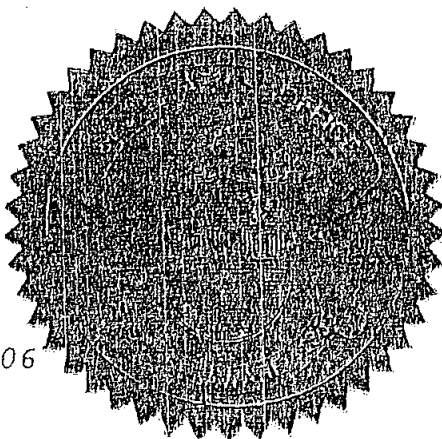


# Delaware

PAGE 1

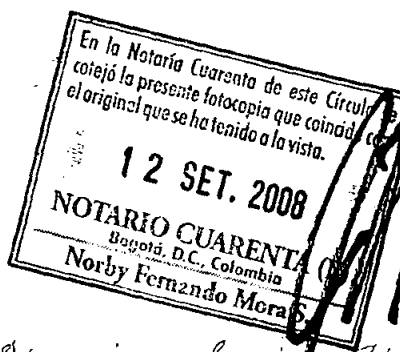
*The First State*

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.

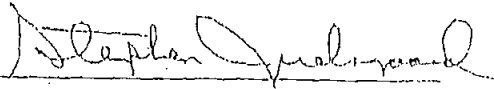
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares 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.

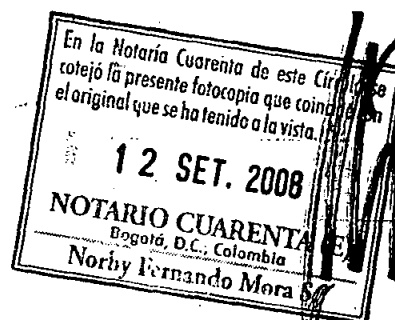
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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





336

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

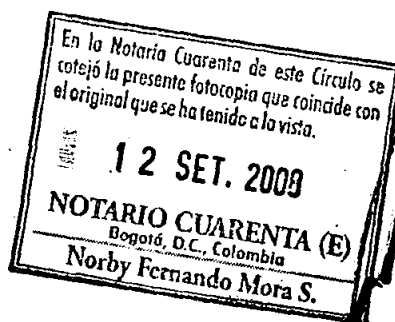
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. Pais: 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

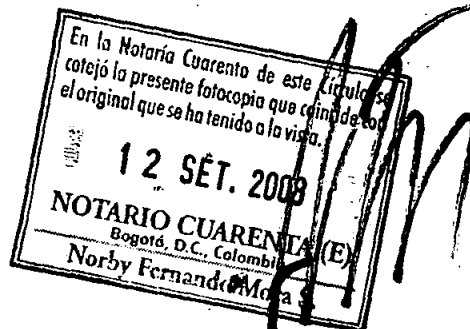
Harriet Smith Windsor (Firma)  
Secretaria de Estado



339

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

340

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.

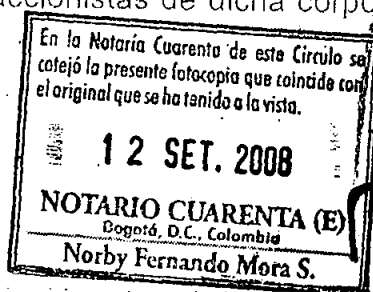
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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 está 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 acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



31

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

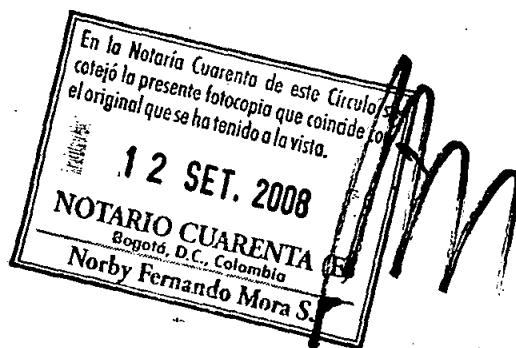
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo  
y Secretaría General.



3/12

# 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

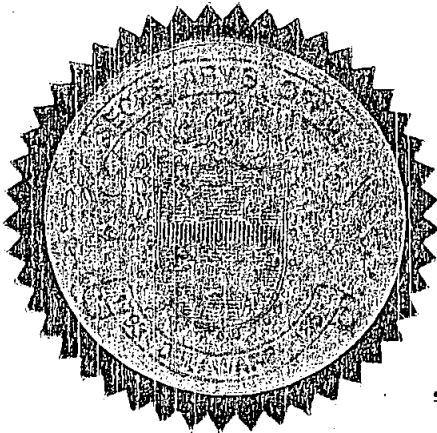
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

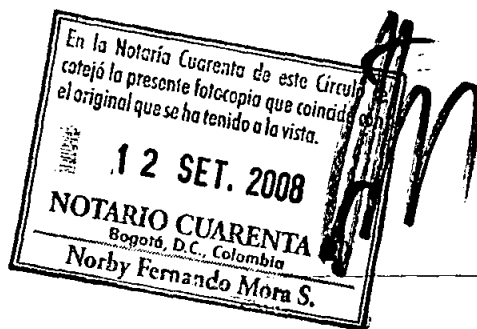
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



# Delaware 347

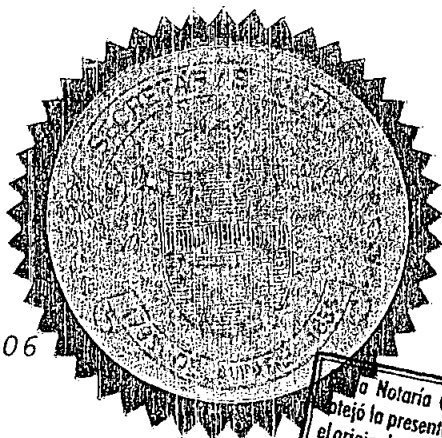
PAGE 1

## 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 TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

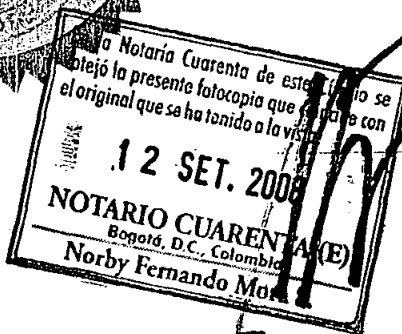
050426506



*Harriet Smith Windsor*

Harriet Smith Windsor, Secretary of State  
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT  
OF AMENDED AND RESTATED  
CERTIFICATE OF INCORPORATION

344

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



APOSTILLA

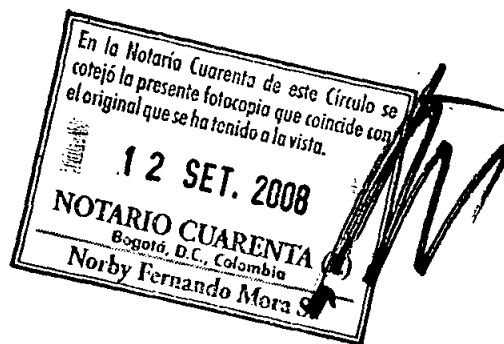
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

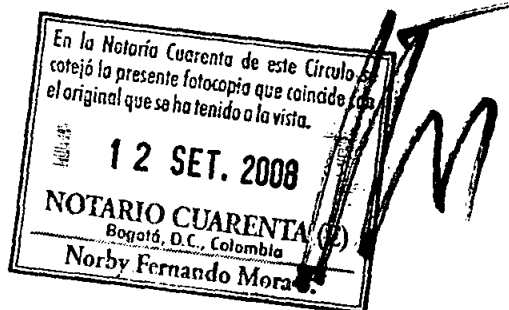




DELAWARE  
EL PRIMER ESTADO

316

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

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL 347  
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.

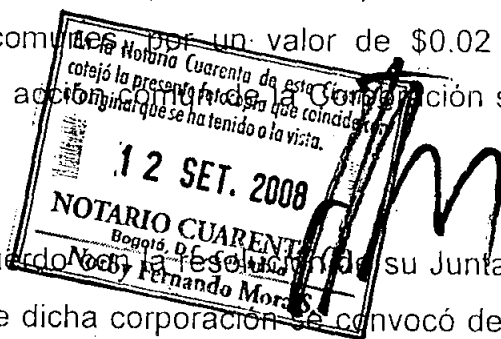
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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 enmiende 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.



348

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

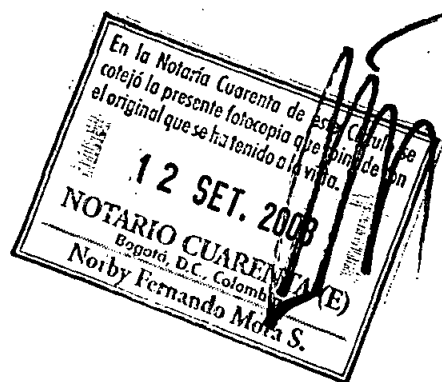
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo  
y Secretaría General.



**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 129889          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2007/070516 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 06/01/2009        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 0612              |

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 Unica 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 \_\_\_\_\_  
jfernand

23 ENE. 2009