



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

BT
01
26+



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

01-22898

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODOS TERAPEUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS

OCULARES VASCULARES CON ANTAGONISTAS DE DII4

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SYNTHES GMBH

DOMICILIO

OBERDORF, SUECIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-022898- -00000-0000

Fecha: 2009-03-05 16:51:53 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: REGENERON
PHARMACEUTICALS, INC.
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de New York, Estados
Unidos de América

Dirección: 777 Old Saw Mill River Road,
Tarrytown,
New York 10591,
Estados Unidos de América

Domicilio: Tarrytown,
New York 10591,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.☐

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.☒

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Stanley, J. WIEGAND
15 Fox Run Road,
Croton-on-hudson,
New York 10520,
Estados Unidos de América

3. Ivan, B. LOBOV
326 25th Street, Apt.2d,
New York,
New York 10010,
Estados Unidos de América

2. Nicholas, J. PAPADOPOULOS
59 Heritage Lane,
Lagrangeville,
New York 12540,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2007/017546 Fecha: 7 de agosto de 2007
Publicación Internacional No. WO 2008/019144 A2 Fecha: 14 de febrero de 2008

6

Título (54)
MÉTODOS TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS
OCULARES VASCULARES CON ANTAGONISTAS DE DII4

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/039

8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
		<u>US</u>	<u>7 de agosto de 2006</u>	<u>60/836,003</u>

9

Comprobante de pago No.: 09-16,800 Fecha: 2 de marzo de 2009

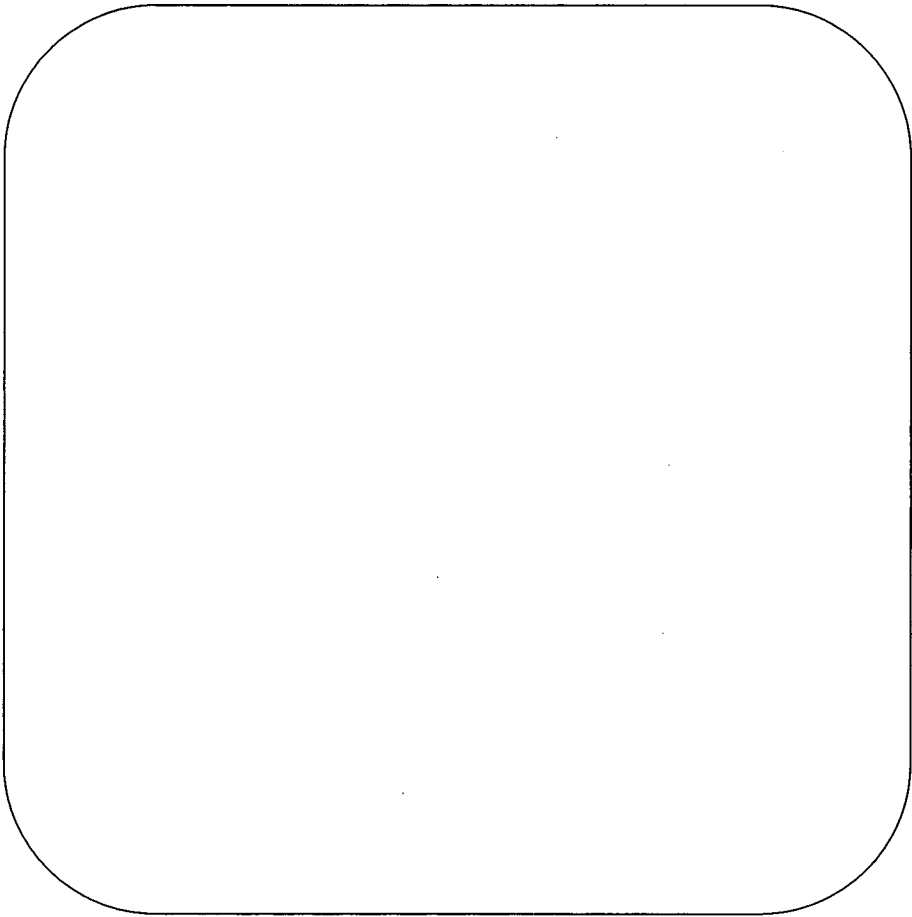
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ 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: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

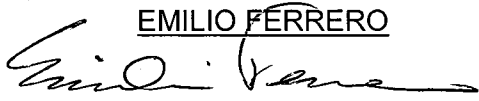
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/019144 A2

Descripción:

Páginas 14 en el idioma original

Páginas 19 en español

Reivindicaciones: Número (s) 7

Figuras: Número (s) 10

2. ☒ Listado de Secuencias.

3. ☒ Extracto de publicación

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

4

343

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. Country: **United States of America**
This public document
- 2. has been signed by **Gloria D'Amico**
- 3. acting in the capacity of **County Clerk**
- 4. bears the seal/stamp of the county of **Queens**

Certified

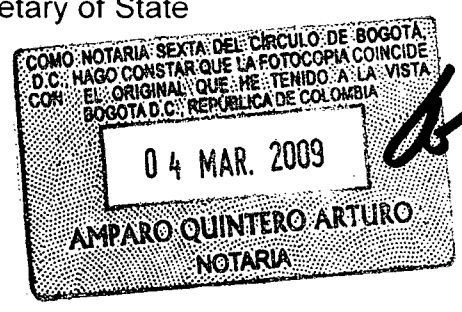
- 5. At New York, New York
- 6. the 18th day of December 2008
- 7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
- 8. No. NYC-10643439A
- 9. Seal/Stamp
- 10. Signature

James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State



04135595.RSL (REV. 2/0/96)



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

domiciliado (s) en/of

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, N.Y. 10590, United States of America

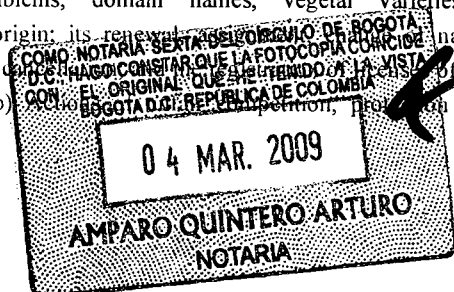
hereby ratify the patent app. #08138158 filed by Emilio Ferrero on December 30, 2008

el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en cumplimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

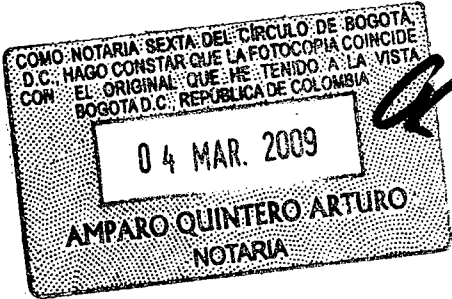
In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, transfer, change of name or domicile, voluntary or involuntary cancellation, and the use of the above rights; b) Registration of unfair competition, protection to the



b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 10 December 2008
en/in Tarrytown, New York, US
por/by Valetta Gregg
Valetta Gregg
Firma Signature



7

State of New York } ss:
County of Queens }

No. 160492

(Form)

I, GLORIA D'AMICO, Clerk of the County of Queens, and Clerk of the Supreme Court in and for said county, the same being a court of record having a seal, DO HEREBY CERTIFY THAT

Yung-Zi Yang
whose name is subscribed to the annexed original instrument has been commissioned and qualified as a NOTARY PUBLIC



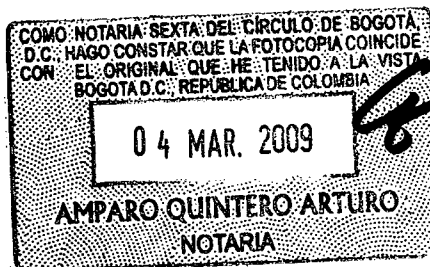
and has filed his autograph signature in this office and that he/she was at the time of taking such proof or acknowledgment or oath duly authorized by the laws of the State of New York to take the same; that he is well acquainted with the handwriting of such public officer or has compared the signature on the certificate of proof or acknowledgment or oath with the autograph signature filed in his office by such public officer, and he believes that the signature on the original instrument is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and my official seal this

day of

DEC 16 2008

Gloria D'Amico
County Clerk, Queens County



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____
es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo
de _____
de la compañía _____,
sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a
las leyes de _____,
que la dirección de dicha compañía es _____,
y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los
documentos respectivos y de todo ello da fe.
Dado y firmado en _____

El _____

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature
of Valeta Gregg _____
is authentic; that the signatory currently acts in the position of
Assistant general Counsel, Vice President, Patents _____
of the company
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
a company currently existing and organized under the laws
of New York, US
_____,
that the address is
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10590,
United States of America
and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon
examination of the corresponding documents.
Given and signed in Tarrytown, New York, US _____

On 10 December 2008 _____

El Notario Público
(Firma-sello)

The Notary Public
(Signature-seal)

YING-ZI YANG
Notary Public - State of New York
No. 01YA6136005
Qualified in Queens County
My Comm. Expires Oct. 31, 2009

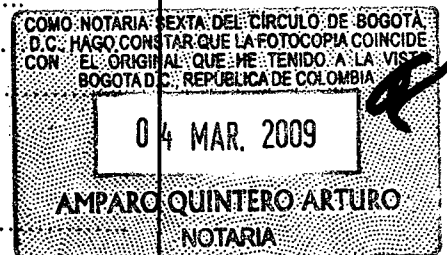
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Country: _____
This public document
- has been signed by _____
- acting in the capacity of _____
- bears the seal/stamp of _____

Certified

- at _____
6. the _____
- by _____
- No. _____
- Seal/stamp _____
10. Signature _____



9

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 03.03/09b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**, domiciliada en 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10590, Estados Unidos de América, **por el presente ratifica la solicitud de patente #08138158 presentada por el Dr. Emilio Ferrero el 30 de diciembre de 2008** y adicionalmente otorga derechos de representación y poder a los Doctores Emilio Ferrero, tpa. 31929; Luz Clemencia de Páez tpa. 23555 y Daniel Páez, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 10 de diciembre de 2008 en Tarrytown, Nueva York, Estados Unidos de América por Valeta Gregg.

Firma _____ Firma Ilegible

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

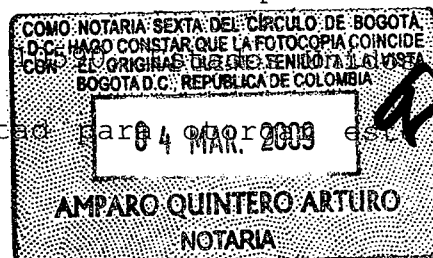
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

El suscrito Notario certifica: Que la firma que antecede de Valeta Gregg es auténtica, que el signatario desempeña actualmente en cargo de Asesor Legal Asistente, Vicepresidente, Patentes, de la compañía REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de Nueva York, Estados Unidos de América, que la dirección de dicha compañía es 777 Old Mill River Road, Tarrytown, New York de América y que el signatario tiene facultad para este documento.

El Notario Público tiene conocimiento y da fe de los hechos anteriores después de haber examinado los documentos correspondientes.



10

Dado y firmado en Tarrytown, Nueva York, Estados Unidos de América
el 10 de diciembre de 2008.

Firma Ilegible

El Notario Público

YING-ZI YANG
Notario Público - Estado de Nueva York
No. 01YA6136005
Calificado en el Condado de Queens
Mí Comisión Vence Oct. 31 de 2009

(Anexo)

Estado de Nueva York,)
Condado de Queens) Declaración Juramentada

No. 160492

Forma 1

Yo, GLORIA D'AMICO, Secretaria del Condado de Queens y
Secretario de la Corte Suprema en y para dicho condado, el cual es
un tribunal de registro que tiene por ley un sello, POR EL
PRESENTE CERTIFICO QUE

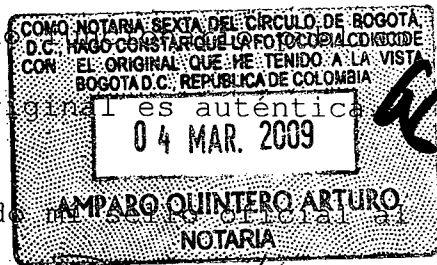
Ying-Zi Yang

cuyo nombre está suscrito en el anexo instrumento original ha sido
comisionado y calificado como NOTARIO PÚBLICO

y ha presentado su firma autógrafa en esta oficina y que al momento
de tomar dicha prueba o reconocimiento o juramento él/ella estaba
debidamente autorizado por las leyes del Estado de Nueva York para
tomar los mismos; que él está bien familiarizado con la escritura
de dicho funcionario público o ha comparado la firma que aparece en
el certificado de prueba o reconocimiento o juramento con la firma
autógrafa presentada ante su oficina por dicho funcionario público
y él considera que la firma en el documento original es auténtica

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he firmado y colocado mi sello
presente hoy

DIC 16 DE 2008



DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

Firma ilegible

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA
Secretario de Condado, Condado de Queens

Apostilla

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. País: **Estados Unidos de América**
Este documento público
2. ha sido firmado por **Gloria D'Amico**
3. actuando en calidad de **Secretario de Condado**
4. lleva el sello/estampilla del condado de **Queens**

Certificado:

5. en Nueva York, Nueva York
6. el 18 de diciembre de 2008
7. por el Suplente Especial del Secretario de Estado, Estado de Nueva York
8. **No. NYC-10643439A**
9. Sello/estampilla:
10. Firma:

EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE NUEVA YORK

Firma ilegible

James Bizzarri

Suplente Especial del Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-145820\WPCL002H\COLO 16813-841-001-9

NO SE ACEPTA
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
882685
Diego Vargas
SECRETARÍA DE
GOBIERNO Y
ASISTENTES
ASISTENTES

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 MAR -3 A 11:10

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA

04 MAR. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2008 (14.02.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/019144 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/39 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/017546

(22) International Filing Date: 7 August 2007 (07.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/836,003 7 August 2006 (07.08.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WIEGAND, Stanley, J. [US/US]; 15 Fox Run Road, Croton-on-hudson, NY 10520 (US). PAPADOPOULOS, Nicholas, J. [US/US]; 59 Heritage Lane, Lagrangeville, NY 12540 (US). LOBOV, Ivan, B. [RU/US]; 326 25th Street, Apt. 2d, New York, NY 10010 (US).

(74) Agent: GREGG, Valeta; Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10519 (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
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

WO 2008/019144 A2

(54) Title: THERAPEUTIC METHODS FOR TREATING VASCULAR EYE DISORDERS WITH DLL4 ANTAGONISTS

(57) Abstract: A therapeutic method for treating ischemic or vascular disorders by administering an agent capable of inhibiting human delta-like ligand 4 (Dll4) activity to a subject in need thereof. Preferably, the agent is an anti-Dll4 antibody or antibody fragment capable of inhibiting the binding of Dll4 to a Notch receptor. In one embodiment, the ischemic or vascular disorder is ischemic injury, cerebral ischemia, cardiac ischemia, ischemic conditions affecting the limbs and other organs or tissues, arteriovenous malformations, wound healing, organ or tissue transplantation, placental insufficiency, arterial narrowing and occlusion, atherosclerosis, and systemic or pulmonary hypertension. In another embodiment, the disease treated is an eye disease or condition such as retinopathy of prematurity, ischemic retinopathy, retinal vein or artery occlusion, diabetic retinopathy, choroidal neovascularization, age related macular degeneration, corneal neovascularization, neovascular glaucoma or corneal transplantation.

513

Therapeutic Methods for Treating Vascular Eye Disorders with Dll4 Antagonists

Field of the Invention

[0001] This invention relates generally to methods for treating vascular and ischemic disorders by administering compositions that inhibit Dll4 interaction with Notch receptors, and/or Notch receptor activation. More specifically, this invention relates to methods of treating eye vascular and/or ischemic disorders by administering compositions that inhibit Dll4 interaction with Notch receptors.

Background

[0002] Angiogenesis is a fundamental process required for the normal development and growth of tissues and organs, and involves formation of new blood vessels from pre-existing vessels. Angiogenesis and blood vessel homeostasis are tightly controlled through a highly regulated system of angiogenic modulators. Deviation from such a tight control often leads to or is associated with disease.

[0003] While unregulated "excessive" or aberrant angiogenesis is characteristic of numerous disease states, insufficient angiogenesis, loss of blood vessels or functional or structural blood vessel occlusion can also be a serious medical problem. Promoting angiogenesis and/or preventing regression of existing blood vessels is desirable in situations where tissue becomes ischemic, for example in retinal, cerebral, cardiovascular and limb ischemia and in conditions where a vascular supply must be established, re-established, enhanced or expanded, for example in wound healing and after tissue or organ transplantation, or to stimulate establishment of collateral vessels or otherwise increase the perfusion of a tissue or organ with inadequate circulation.

[0004] The Notch-signaling pathway is a system for cell-to-cell communication used by a wide range of eukaryotes for many biological processes, such as differentiation, proliferation, and homeostasis (Artavanis-Tsakonas et al. (1999) Science 284:770-776). Notch signaling has also been implicated in the control of vascular development (Iso et al. (2003) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23:543-553).

[0005] Delta-like 4 (Dll4) or delta-like ligand 4 (Dll4) (hereinafter "Dll4") is a member of the Delta family of Notch ligands which exhibits highly selective expression by vascular endothelium (Shutter et al. (2000) Genes Dev. 14:1313-1318). Dll4 is a ligand for Notch receptors, including Notch1 and Notch 4. The nucleic acid and amino acid sequences for human and mouse Dll4 are shown in SEQ ID NO:1-2 and SEQ ID NO:3-4, respectively. Gene-targeted Dll4 mice have been generated (see, for example, Duarte et al. (2004) Genes Dev. 18:2474 - 2478; Krebs et al. (2004) Genes Dev. 18:2469 - 2473; Gale et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:15949-15954). These studies showed that Dll4 was highly expressed on developing blood vessels in the mouse embryo, and that genetic deletion of even a single Dll4 allele resulted in embryonic lethality, associated with marked

614

vascular abnormalities.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The present invention relates to methods of treating diseases affecting the cardiovascular system with agents capable of blocking the interaction of Dll4 with its receptors ("Dll4 antagonists"). The experimental results provided herein support the use of Dll4 antagonists for treating diseases characterized by pathological neovascularization and vascular insufficiency, where vascular insufficiency is due to the loss of blood vessels or functional vascular changes resulting in insufficient tissue perfusion. Dll4 antagonists are particularly useful for treating vascular disorders of the eye, for example, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity and other ocular diseases characterized by pathological angiogenesis and/or retinal ischemia, such as retinal vein or artery occlusion.

[0007] Pharmacological inhibition of Dll4 is shown to exert several beneficial effects in a model of ischemic retinopathy, including attenuation of blood vessel loss when applied at the time of an injury leading to blood vessel loss, and suppression of the development of pathological changes in the vasculature while enhancing the regrowth of more normal, functional blood vessels when applied following the establishment of ischemia.

[0008] Pharmacological agents which inhibit Dll4 signaling are expected to be similarly beneficial in treating other forms of ischemic injury, including cerebral ischemia, cardiac ischemia, and ischemic conditions affect the limbs and other body organs or tissues. Dll4 inhibitors are also expected to be clinically beneficial in other conditions requiring the establishment or re-establishment of a vascular supply or that would otherwise benefit from enhanced tissue perfusion. Examples of such conditions are arteriovenous malformations, wound healing, organ or tissue transplantation, and placental insufficiency. As shown in the experimental work reported below, Dll4 inhibition prevents arterial narrowing and occlusion, indicating that Dll4 inhibitors would also be effective in treating systemic or pulmonary hypertension, and related disorders.

[0009] Dll4 antagonists are now shown to be effective in promoting productive angiogenesis in both normal and pathological conditions. Specifically, blocking Dll4-Notch signaling is shown to enhance angiogenic sprouting and vascular endothelial cell proliferation in the developing retinal vasculature, and to suppress formation of pathological, ectopic neovascularization and the development of arteriovenous shunts in favor of more appropriate vessel formation in the ischemic retina. Moreover, the application of Dll4 blockers at the time of vessel injury is shown to markedly reduce the subsequent loss of blood vessels. These findings support the use of a Dll4 antagonist in the treatment of eye diseases characterized by vascular abnormalities, especially when accompanied by ischemia and loss of normal vessels. Examples of such eye diseases include ischemic retinopathies, such as age-related macular degeneration, central retinal vein occlusion or branch retinal vein occlusion, diabetic retinopathy, and retinopathy of prematurity.

[0010] In a first aspect, the invention features a method of treating an eye disorder or disease

215

characterized by vascular abnormalities, comprising administering a Dll4 antagonist to a subject in need thereof. The method of the invention promotes growth of functional normal vessels, inhibits the growth of abnormal or disordered vessels and prevents pathological regression of blood vessels.

[0011] In one embodiment, the Dll4 antagonist is an antibody or antibody fragment which specifically binds Dll4 and blocks Dll4 binding to a Notch receptor (for example, Notch1 and Notch 4 receptors). In another embodiment, the Dll4 antagonist of the invention is a protein or protein fragment comprising the extracellular domain of Dll4 or a fragment thereof, which in specific embodiments may be fused to a multimerizing component and which binds Notch receptors without activating them, thereby blocking the actions of endogenous Dll4.

[0012] The eye disorder or disease treated by the method of the invention is a disorder of the ocular vasculature characterized by the presence of abnormal vessels and/or loss of normal vessels or normal vessel function. In specific embodiments, the condition or disorder treated includes retinopathy of prematurity, ischemic retinopathy, retinal vein or artery occlusion, diabetic retinopathy, choroidal neovascularization, age related macular degeneration, corneal neovascularization, neovascular glaucoma or corneal transplantation.

[0013] The antibody or antibody fragment used in the method of the invention may be polyclonal or monoclonal, and may be humanized, chimeric, or fully human. Preferably the antibody is a fully human monoclonal antibody or monoclonal antibody fragment. The antibody fragment may be a single chain antibody, ScFv, an Fab, or an F(ab')₂.

[0014] When the Dll4 antagonist is a protein or protein fragment, the fragment is preferably the extracellular domain of Dll4 or a fragment or modified fragment thereof, and may be fused to a multimerizing component. The multimerizing component is preferably an immunoglobulin domain, such as for example an Fc domain, e.g., a human Fc (SEQ ID NO:5). The protein may optionally comprise a signal sequence, which may be native to the cell, recombinant, or synthetic.

[0015] In a broader aspect, the method of the invention is useful to treat any ischemic disease or condition caused by insufficient blood supply due to blood vessel loss and/or poor perfusion, for example, ischemic injury, cerebral ischemia, cardiac ischemia, ischemic conditions affecting the limbs and other organs or tissues, arteriovenous malformations, wound healing, organ or tissue transplantation, placental insufficiency, arterial narrowing and occlusion, atherosclerosis, and systemic or pulmonary hypertension.

[0016] In a second aspect, the invention provides the use of an agent capable of inhibiting Dll4 activity in the manufacture of a medicament for treating, inhibiting or ameliorating an ischemic or vascular disorder, wherein the Dll4 antagonist is an antibody or antibody fragment capable of blocking the binding of Dll4 to a Notch receptor, or a Dll4 fragment optionally connected to a multimerizing component (such as an Fc domain). In one embodiment, the ischemic or vascular disorder is an eye disease or condition characterized by the presence of abnormal blood vessels

8
16

and/or loss of normal blood vessels or vessel function. The eye disease is retinopathy of prematurity, ischemic retinopathy, retinal vein or artery occlusion, diabetic retinopathy, choroidal neovascularization, age related macular degeneration, corneal neovascularization, neovascular glaucoma or corneal transplantation.

[0017] In another embodiment, the ischemic or vascular disorder is ischemic injury, cerebral ischemia, cardiac ischemia, ischemic conditions affecting the limbs and other organs or tissues, arteriovenous malformations, wound healing, organ or tissue transplantation, placental insufficiency, arterial narrowing and occlusion, atherosclerosis, or systemic or pulmonary hypertension.

[0018] Other objects and advantages will become apparent from a review of the ensuing detailed description.

BRIEF SUMMARY OF THE FIGURES

[0019] Fig. 1. Genetic deletion of a single Dll4 allele increased numbers of angiogenic sprouts in the developing retinal vasculature. Numbers of sprouts were quantified in 100X microscopy fields. Results were significantly different at the $p < 0.00001$ level.

[0020] Fig. 2. Intraocular delivery of Dll4-Fc increased numbers of proliferating BrdU-positive cells in the developing retinal vasculature. 4.15 mcg of mDll4-hFc or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally in 7 days old mouse pups. Retinal vasculature was analyzed 24 hours later. Numbers of BrdU positive cells were quantified in 200X microscopy fields. Results were significantly different at the $p < 0.05$ level.

[0021] Fig. 3A-B. Intraocular delivery of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody promotes the regrowth of retinal vessels in mice with oxygen-induced ischemic retinopathy (OIR). (A) 0.48 mcg of mDll4-hFc or 0.5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally in 13 days old (postnatal day 13, or P13) OIR pups. Retinal vasculature was analyzed at P17. (B) 2.55 mcg of rabbit polyclonal anti-mDll4 antibody or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P13. Retinal vasculature was analyzed at P17. Avascular areas were measured in retinal flat-mounts. Results were significantly different at the $p < 0.0001$ (A) and $p < 0.05$ (B) levels.

[0022] Fig. 4A-B. Intraocular delivery of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody ameliorates formation of pathological neovascularization in OIR. (A) 0.48 mcg of mDll4-hFc or 0.5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P13. Retinal vasculature was analyzed at P17. (B) 2.55 mcg of rabbit polyclonal anti-mDll4 antibody or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P13. Retinal vasculature was analyzed at P17. Abnormal vascular areas (areas containing ectopic vascular "tufts") were measured in retinal flat-mounts. Results were significantly different at the $p < 0.0001$ (A) and $p < 0.05$ (B) levels.

[0023] Fig. 5. Intraocular delivery of Dll4-Fc improves retinal perfusion. 0.48 mcg of mDll4-hFc or 0.5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P13. At P17 animals were perfused with tomato lectin labeled with Texas Red and retinal vasculature was analyzed at P17. Non-perfused vascular areas were measured in retinal flat-mounts. Results were significant at the

9/17

$p < 0.0005$ level.

[0024] Fig. 6A-B. Intraocular delivery of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody reduces retinal hypoxia/ischemia. (A) 4.1 mcg of hDll4-hFc or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P12. Hypoxyprobe™-1 was injected intraperitoneally one hour before sacrificing the animals. Retinal vasculature was analyzed at P17. Hypoxyprobe-labeled areas were measured in retinal flat-mounts. (B) 2.55 mcg of rabbit polyclonal anti-mDll4 antibody or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P13. Hypoxyprobe™-1 was injected intraperitoneally one hour before sacrificing the animals. Retinal vasculature was analyzed at P17. Hypoxyprobe-labeled areas were measured in retinal flat-mounts. Results were significantly different at the $p < 0.001$ (A) and $p < 0.05$ (B) levels.

[0025] Fig. 7. Genetic deletion of a single Dll4 allele reduces blood vessel loss induced by exposure to hyperoxia. Dll4^{+/-lacZ} and littermate WT control mice were placed into the 75% oxygen chamber at P7. Retinal vasculature was analyzed in flat-mounts at P12. Results were significantly different at the $p < 0.05$ levels.

[0026] Fig. 8A-B. Intraocular delivery of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody reduces or prevents blood vessel loss induced by exposure to hyperoxia. (A) 4.1 mcg of hDll4-hFc or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P8. Pups were placed into a 75% oxygen environment at P9. Retinas vasculature was analyzed at P10. (B) 2.55 mcg of rabbit polyclonal anti-mDll4 antibody or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P8. Pups were placed into a 75% oxygen environment at P9. Retinal vasculature was analyzed at P10. Results were significantly different at the $p < 0.00001$ (A) and $p < 0.0001$ (B) levels.

[0027] Fig. 9A-B. Intraocular delivery of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody reduces retinal vessel occlusion. (A) 4.1 mcg of hDll4-hFc or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P8. Pups were placed into a 75% oxygen environment at P9. Pups were perfused with fluorescent lectin and retinal vasculature was analyzed at P10. (B) 2.55 mcg of rabbit polyclonal anti-mDll4 antibody or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally at P8. Pups were placed into a 75% oxygen environment at P9. Pups were perfused with fluorescent lectin and retinal vasculature was analyzed at P10. Results were significantly different at the $p < 0.00001$ (A) and $p < 0.0001$ (B) levels.

[0028] Fig. 10. Systemic delivery of Dll4-Fc reduces or prevents retinal blood vessel loss. 4.1 mcg of hDll4-hFc or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally (ITV) or hDll4-hFc was injected intraperitoneally at a dose of 25 mg per kg of the body weight at P7. Pups were placed into a 75% oxygen environment at P8. Retinal vasculature was analyzed at P9. Results were significantly different at the $p < 0.0001$ level.

DETAILED DESCRIPTION

[0029] Before the present methods are described, it is to be understood that this invention is not

X8

limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims.

[0030] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described.

Definitions

[0031] By the phrase "Dll4 antagonist" is meant an agent capable of inhibiting Dll4 biological activity by blocking the interaction of Dll4 with its receptors. Inhibition of Dll4 activity may be through inhibition of receptor activation either with an antibody to Dll4 or with a Dll4 analog or fragment which binds but does not activate the receptor (nonproductive binding). Common inhibitors include but are not limited to antibodies, soluble receptors, oligonucleotide aptamers, peptides or other small molecule antagonists and their derivatives, and modified Dll4 ligands which bind their Notch receptor but are unable to activate signaling through such binding. Other approaches include interfering with the expression of the gene encoding Dll4 or blocking Notch receptor activation, for example with siRNAs or gamma secretase inhibitors, respectively.

[0032] A "neutralizing" or "blocking" antibody, is intended to refer to an antibody whose binding to Dll4 results in inhibition of the biological activity of Dll4. This inhibition of the biological activity of Dll4 can be assessed by measuring one or more indicators of Dll4 biological activity. These indicators of Dll4 biological activity can be assessed by one or more of several standard *in vitro* or *in vivo* assays known in the art (see examples below). Preferably, the ability of an antibody to neutralize Dll4 activity is assessed by inhibition of Dll4 binding to a Notch receptor, such as Notch1 and Notch4.

General Description

[0033] Notch signaling pathways are evolutionarily conserved, and play key roles in cell-fate determination and differentiation in many tissues during embryonic and postnatal development. Major components of the Notch pathway are expressed in the vasculature and genetic deletion of certain Notch pathway components, including Notch1, Notch1/Notch4, Jagged1, Dll1, Dll4, Hey1/Hey2 or presenilins, results in embryonic lethality associated with vascular remodeling defects. Although most of these genes are expressed in multiple tissue and cell types, Dll4 is largely restricted to the vascular endothelium, suggesting that Dll4 is a key ligand for Notch receptors in the vasculature.

[0034] During early embryonic development, genetic deletion of even a single Dll4 allele produces severe vascular abnormalities that result in embryonic lethality in most mouse strains. Indeed, among the many genes involved in vasculogenesis and angiogenesis, haploid insufficiency has been reported to result in major vascular defects and embryonic lethality only for Dll4 and VEGF-A. Early embryonic lethality precludes most experimental manipulations, making it difficult to precisely understand the role of Dll4 during vascular development and in pathological settings.

[0035] To overcome this limitation, the effects of Dll4 gene deletion were studied in mice of the ICR strain, in which haplo-insufficiency produces only limited embryonic lethality. The vascular phenotype observed in these mutant mice was compared to that obtained in wild-type mice in which Dll4/Notch signaling was selectively inhibited by intravitreal injection of a soluble inhibitor of Dll4, Dll4-Fc, or a neutralizing polyclonal antibody against the extracellular domain of Dll4. For these experiments, the retina was selected as a model system in which to study Dll4 biology, because the retinal vasculature develops postnatally in a stereotypic manner that is highly organized, temporally and spatially.

[0036] The murine model of oxygen-induced ischemic retinopathy (OIR) is a well characterized model of pathological neovascularization associated with elevated expression of the essential pro-angiogenic factor, VEGF (Smith et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 35:101-111; Neely et al. 1998 Am J. Pathol 153:665-670; Saint-Geniez et al. 2004 Int J Dev Biol 48:1045-1058) and thus relevant to pathological angiogenesis associated with diverse disease conditions (Ferrara et al. 2005 Nature 438:967-974). Finally, the retinal vasculature is readily accessible to experimental manipulations, including intravitreal microinjections of experimental agents.

[0037] The experiments described below show that during normal retinal vascular development, and in the OIR model, pharmacological suppression of Dll4/Notch signaling markedly enhances angiogenic sprouting and promotes the formation of a denser primary capillary network. Consistent with this, it was found that endogenous Dll4 expression is particularly prominent in the most active regions of vascular growth during both normal development and in the OIR model. Moreover Dll4 inhibition markedly suppressed formation of the abnormal vasculature and prevented blood vessel occlusion and regression.

Dll4 Antagonists

[0038] Dll4 antagonists include antibodies to Dll4 and fragments thereof capable of blocking the binding of Dll4 to a Notch receptor, for example Notch1; and proteins or protein fragments comprising the extracellular domain of Dll4 which may be fused to a multimerizing component; peptides and peptibodies (see for example, US patent publication 2003/0229023 Oliner et al.).

[0039] Dll4 antibodies. The phrase "immunoglobulin or antibody" as used herein refers to a mammalian, including human, polypeptide or protein comprising a framework region from an immunoglobulin gene or fragments thereof that specifically binds and recognizes an antigen, which,

in the case of the present invention, is a Dll4 protein or portion thereof. If the intended antibody or antibody-like protein will be used as a mammalian therapeutic, immunoglobulin binding regions should be derived from the corresponding mammalian immunoglobulins. If the molecule is intended for non-therapeutic use, such as for diagnostics and ELISAs, the immunoglobulin binding regions may be derived from either human or non-human mammals, such as mice. The human immunoglobulin genes or gene fragments include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon, and mu constant regions, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, respectively. Within each IgG class, there are different isotypes (eg. IgG₁, IgG₂, etc.) as well as allotypes thereof.

[0040] An exemplary immunoglobulin (antibody) structural unit of human IgG, comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one light chain (about 25 kD) and one heavy chain (about 50-70 kD). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100-110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms "variable light chain" (V_L) and variable heavy chain (V_H) refer to these light and heavy chains respectively.

[0041] Antibodies exist as intact immunoglobulins, or as a number of well-characterized fragments produced by digestion with various peptidases. For example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce F(ab)₂, a dimer of Fab which itself is a light chain joined to V_H-C_H by a disulfide bond. The F(ab)₂ may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region, thereby converting the F(ab)₂ dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially Fab with part of the hinge region. While various antibody fragments are described in terms of the digestion of an intact antibody, one of skill will appreciate that such fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by using recombinant DNA methodology. Thus, the terms antibody, as used herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies, or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies, or generated via display libraries such as phage, *E. coli* or yeast display libraries (see, for example, McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554).

[0042] Dll4 analogs or protein fragments. The Dll4 antagonist may be a Dll4 fragment optionally connected to a multimerizing component. In specific embodiments, a Dll4 fragment may be fused to a multimerizing component such as an immunoglobulin domain, a truncated immunoglobulin domain, or an amino acid sequence between 1 to about 500 amino acids in length, optionally comprising at least one cysteine residue. In a preferred embodiment, the multimerizing component is an immunoglobulin domain, preferably an Fc domain, e.g., a human Fc (SEQ ID NO:5). The protein or protein fragment may optionally comprise a signal sequence, which may comprise any sequence known to a skilled artisan for directing secretion of a polypeptide or protein from a cell,

13
21

including natural or synthetic sequences. Generally, a signal sequence is placed at the beginning or amino-terminus of the fusion protein of the invention. Such a signal sequence may be native to the cell, recombinant, or synthetic.

[0043] The extracellular domain of Dll4 is composed of a Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) domain and eight epidermal growth factor (EGF)-like tandem repeats. Generally, the EGF domains are recognized as occurring at about position 218-251 (domain 1), 252-282 (domain 2), 284-322 (domain 3), 324-360 (domain 4), and 362-400 (domain 5), with the DSL domain at about position 173-217 and the N-terminal domain at about position 27-172 of hDll4 (SEQ ID NO:2). In specific embodiments, the Dll4 antagonist comprises about amino acid 27-172, 27-217, 218-400, 218-360, 218-322, or 218-282 of SEQ ID NO:2, optionally fused to hFc (SEQ ID NO:5).

Methods of Administration

[0044] The invention provides methods of treatment comprising administering to a subject an effective amount of an agent of the invention. In a preferred aspect, the agent is substantially purified (e.g., substantially free from substances that limit its effect or produce undesired side-effects). The subject is preferably an animal, e.g., such as a cow, pig, horse, chicken, cat, dog, etc., and is preferably a mammal, and most preferably human. In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved, for example, and not by way of limitation, by local infusion during surgery, topical application, e.g., by injection, by means of a catheter, or by means of an implant.

[0045] The methods of the invention may be advantageously performed by administration to the area in need of treatment by local administration, including intravitreal, intraocular, periorbital, subconjunctival, juxtasceral, subtenon, or topical administration.

Combination Therapies

[0046] In various embodiments, the method of the invention is accomplished with a Dll4 antagonist, such as a Dll4 antibody, in combination with one or more additional compounds or therapies or medical procedures. For example, suitable therapeutic agents for use in combination, either alternating or simultaneously, include fusion proteins capable of binding and inhibiting the activity of vascular endothelial growth factor (VEGF) (see U.S. 7,070,959 and 7,087,411), immunosuppressive agents such as corticosteroids, dexamethasone, cyclosporin A, FK506, or anti-metabolic agents, (see Barker, NH, *et al.*, (2000) Clin Exp Ophthal 28:357-360). Other suitable therapeutic agents for use in combination, either alternating or simultaneously, with the Dll4 antagonists of the invention may include agents that can block the biological activity of other VEGF family members such as VEGF-C and VEGF-D.

H
22

EXAMPLES

[0047] The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the methods and compositions of the invention, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, areal measurements, etc.) but some experimental errors and deviations should be accounted for.

Example 1. Effect of genetic deletion of a single Dll4 allele on blood vessel sprouting in the developing retinal vasculature.

[0048] An investigation was undertaken to determine the effects of Dll4 partial genetic deficiency on blood vessel sprouting during normal developmental retinal angiogenesis.

[0049] Animals. Velocigene™ technology (Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:652-9; US Patent 6,586,251) was used to replace the entire Dll4 coding region with the β -galactosidase reporter gene in C57BL/6:129 hybrid mouse embryonic stem cells. Chimeric males were bred to ICR females. Dll4^{+/-lacZ} mice backcrossed for 3 generations to ICR (87.5% ICR) were used for this study.

[0050] Histochemistry and Immunostaining. Mouse pups were humanely euthanized at P7. Eyes were enucleated, and retinas were dissected, fixed overnight with 4% paraformaldehyde, stained with FITC-labeled Griffonia simplicifolia (GS) lectin I (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and flat-mounted. Images were taken by using a Nikon (Melville, NY) microscope.

[0051] Quantifications. Measurements were performed using the Scion Image software. Each experimental condition was assayed at least in triplicate. Student's t-test and two-way analysis of variance were used to assess statistical significance.

[0052] Results. Peripheral plexus was much denser in Dll4^{+/-lacZ} mice than in wild-type littermates. Higher-power views highlighted that the denser peripheral plexus in the retinas of Dll4^{+/-lacZ} mice consisted of capillaries that were larger in diameter, more highly interconnected and hyperfused, so that in some areas the vessels coalesced to form a syncytium, and, in addition, that there were many more sprouts at the growing front (Fig. 1); filopodia also were observed in more interior portions of the plexus at a higher than normal frequency. Quantitative analyses revealed that, compared to wild type controls, retinas of Dll4^{+/-lacZ} mice showed a 68% increase in the number of sprouts at the growing front of the superficial retinal vasculature (Fig. 1), as well more than a two fold increase in the number of capillary interconnections per unit area, resulting in a significant increase in the vascular coverage. Despite the marked morphologic changes, intravascular injection of fluoresceinated lectin completely filled the developing superficial vascular plexus, except for the filopodia extending from the tip cells, in Dll4^{+/-lacZ} mice as in wild-type mice, indicating that all components of the developing vasculature had lumens and were functional.

15
23

Example 2. Effect of Dll4/Notch inhibition with Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody on the developing retinal vasculature.

[0053] An investigation was undertaken to determine the effects of Dll4/Notch signaling pharmacological inhibition on endothelial cell proliferation and blood vessel sprouting during normal developmental retinal angiogenesis.

[0054] Antibodies and reagents. Dll4-Fc comprises the extracellular domain of mouse or human Dll4 and the Fc part of human IgG. Dll4-Fc was expressed in CHO cells and affinity purified by protein-A chromatography. Anti-Dll4 antibody was produced by immunization of rabbits with recombinant mDll4-hFc. The anti-serum was partially purified by protein-A chromatography prior to use.

[0055] Animals. C57/Bl6 mice (Taconic) were used to study the effect of Dll4-Fc or neutralizing Dll4 antibody on developing retinal vasculature.

[0056] Intravitreal microinjections. Intravitreal microinjections (30 –100 nl) of the research compounds were made between the equator and the corneal limbus by using a Drummond Scientific (BroPA) nanoinjector equipped with a glass needle.

[0057] BrdU labeling. Proliferating cells were labeled by administration of BrdU (1 mg/kg i.p.) 20 h after intravitreal injection of hFc or Dll4-Fc. Retinas were harvested 4 h later and stained with anti-BrdU (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) and VE- Cadherin (BD PharMingen, San Diego, CA) antibodies.

[0058] Results. To study the effect of local intraretinal deficiency in Dll4/Notch signaling, and not secondary to an undetected systemic abnormality, a soluble version of Dll4 (termed Dll4-Fc) that binds Notch receptors without activating them, thereby blocking the actions of endogenous Dll4, or a neutralizing polyclonal antibody specific for the extracellular domain of Dll4, was injected into the vitreous of wild-type mice. Three days after intraocular administration of either Dll4 blocker, the retinal vessels exhibited morphologic changes that closely resembled the vascular abnormalities found in Dll4^{+/-lacZ} mice, including dramatically increased blood vessel density and vessel caliber. Moreover, these characteristic morphologic changes occurred rapidly, being clearly evident within 24 hours.

[0059] BrdU labeling also showed an increase in endothelial cell proliferation within 24 h of Dll4 blockade (Fig. 2). The observed ~17 % increase in the proliferation rate could yield more than 50% increase in cell number within three to four doubling times.

Example 3. Effect of Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on retinal vascularization, perfusion and vascular abnormalities in mice with OIR.

[0060] An investigation was undertaken to determine the effects of the Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on the growth of retinal vessel, formation of vascular abnormalities and retinal perfusion in oxygen-induced ischemic retinopathy (OIR).

1624

[0061] To determine whether Dll4/Notch signaling plays a role in pathologic angiogenesis as well as during normal development, the OIR model was utilized. In the OIR model, exposure of mouse pups to hyperoxia at P7 results in a rapid obliteration of capillaries in the central retina. Following return to room air at P12, the avascular zone becomes severely hypoxic, which in turn elicits extensive abnormal neovascularization, characterized by the ectopic growth of vessels into the vitreous (epiretinal vascular 'tufts') and the formation of abnormal arteriovenous shunts; central parts of the retina remain largely avascular for an extended period.

[0062] Animals and OIR model. C57/Bl6 mice (Taconic) were used to study the effect of Dll4-Fc or neutralizing Dll4 antibody on retinal neovascularization in OIR. OIR was produced following the method developed by Smith et al. (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994, 35:101-111). Briefly, mouse pups and their dams were placed into a 75% oxygen environment from postnatal days (P) 7 to P12, and then returned to room air. Exposure to hyperoxia induces rapid vasoobliteration in the central retina. When mice are returned to room air (P12), the loss of vessels from the central retina results in severe hypoxia / ischemia which in turn stimulates the pathological vascular changes described above.

[0063] To label patent blood vessels, 50 µl of Texas red-labeled Lycopodium esculentum (LE) lectin (1 mg/ml; Vector Laboratories, CA) was injected into the left cardiac ventricle and allowed to circulate for 5 min.

[0064] Results. Dll4/Notch inhibition with either Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody ameliorated pathological neovascularization (Fig. 3A-B), stimulated growth of new blood vessel (Fig. 4A-B) and improved retinal re-perfusion (Fig. 5).

[0065] Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody or a control protein (hFc) was injected intravitreally at P13, one day after the animals were returned to room air, well after vaso-obliteration was complete. When the retinas were evaluated at P17, administration of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody dramatically suppressed the ectopic growth of pathological neovascular tufts into the vitreous (Fig. 1), and also prevented the formation of abnormal arteriovenous shunts. The areas occupied by neovascular tufts was reduced by 43% in the retinas treated with Dll4-Fc and by 85% in the retinas treated with anti-Dll4 antibody both comparing to hFc treated control retinas.

[0066] Moreover, Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody were found to stimulate more extensive sprouting of new vessels from capillaries and veins bordering the avascular zone, resulting in a more rapid re-growth of blood vessels into the central retina where the vasculature had been depleted thus reducing the avascular retinal area (Fig. 4A-B). The avascular areas were reduced by 43% in the retinas treated with Dll4-Fc and by 63% in the retinas treated with anti-Dll4 antibody. Particularly notable was the extensive capillary re-growth emanating from veins in the avascular zone of Dll4-Fc treated retinas. Thus, attenuation of Dll4/Notch signaling favored the extension of new vascular sprouts along the retinal surface, and obviated the formation of epiretinal neovascularization, resulting in a more rapid reformation of the superficial vascular plexus. The new forming vessels

1A25

were functional and exhibited improved retinal reperfusion as evident by 45% reduction of nonperfused areas in Dll4-Fc treated retinas (Fig. 5).

Example 4. Effect of Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on retinal hypoxia/ischemia in the OIR model.

[0067] An investigation was undertaken to determine the effects of the Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on retinal hypoxia/ischemia in the OIR model of pathological neovascularization.

[0068] Excessive blood vessel growth under certain circumstances may interfere with normal blood circulation and reduce tissue oxygenation. To test whether Dll4/Notch inhibition can improve tissue oxygenation, HYPOXYPROBE™-1 (Chemicon) was used in a non-invasive assay to detect tissue hypoxia and determine the effect of Dll4-Fc treatment on retinal hypoxia/ischemia. HYPOXYPROBE™-1 was injected intraperitoneally at 100 mg/kg one hour prior to collecting the retinas for evaluation.

[0069] Results. The growth of functional new vessels following intravitreal administration of Dll4/Notch inhibitors effectively reduced tissue hypoxia/ischemia as evident by 69% and 30% reduction of hypoxyprobe-positive areas in Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody treated retinas, respectively (Fig. 6A-B).

Example 5. Genetic deletion of a single Dll4 allele reduces hyperoxia-induced vaso-obliteration.

[0070] An investigation was undertaken to determine the effects of Dll4 partial genetic deficiency on hyperoxia-induced blood vessel regression.

[0071] Animals. Dll4^{+/-lacZ} mice backcrossed for 3 generations to ICR (87.5% ICR) were generated as described above. Due to a recessive (rd/rd) mutation the retinal photoreceptor cell layer starts to degenerate at P12 in ICR mice. Therefore, to obviate potential secondary effects of photoreceptor loss on the retinal vasculature, for evaluating later stages of retinal development and for all OIR experiments, Dll4^{+/-lacZ} (87.5% ICR) mice were backcrossed to C57BL/6 to produce Rd/rd mice, which do not exhibit photoreceptor degeneration.

[0072] Mouse pups were placed into a 75% oxygen environment from postnatal days (P) 7 to P12. Retinas were harvested and retinal vasculature was analyzed in flat-mounts.

[0073] Results. Reduced expression of Dll4 in the retinal vasculature of Dll4^{+/-lacZ} mice partially prevents hyperoxia-induced retinal blood vessel loss (Fig. 7). In the OIR model, exposure of mouse pups to hyperoxia at P7 results in a rapid occlusion and obliteration of capillaries in the central retina. To determine whether Dll4/Notch inhibition may have a protective effect on blood vessels, the effect of Dll4 partial genetic deficiency in Dll4^{+/-lacZ} mice on hyperoxia-induced vasoobliteration was analyzed. Evaluating animals at P12 (so as to assess the extent of hyperoxic vaso-obliteration) it was found that vaso-obliteration was reduced by 40% in Dll4^{+/-lacZ} mice comparing to wild-type

1825

littermate control animals, suggesting that Dll4 inhibitors may protect existing blood vessels from regression.

Example 6. Effects of Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on hyperoxia-induced vaso-obliteration.

[0074] An investigation was undertaken to determine the effects of Dll4/Notch inhibition with Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on hyperoxia-induced blood vessel regression.

[0075] Animals. C57/Bl6 mice (Taconic) were used to study the effect of Dll4-Fc or neutralizing Dll4 antibody on oxygen-induced retinal vaso-obliteration. Intravitreal microinjections of the research compounds were performed at postnatal day 8. At postnatal day 9 pups were placed into a 75% oxygen environment. Retinas were harvested 24 hours later and retinal vasculature was analyzed in flat-mounts.

[0076] Results. Intravitreal injection of Dll4-Fc or anti-Dll4 antibody dramatically reduced areas of obliterating vasculature by 97% and 41% respectively (Fig. 8A-B).

Example 7. Effects of Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on hyperoxia-induced blood vessel occlusion.

[0077] An investigation was undertaken to determine the effects of Dll4/Notch inhibition with Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody on hyperoxia-induced blood vessel occlusion. All procedures were performed as described above.

[0078] Dll4-Fc and anti-Dll4 antibody treatment reduced non-perfused retinal areas by 40% and 29% respectively (Fig. 9A-B).

Example 8. Effects of systemic administration of Dll4-Fc on hyperoxia-induced blood vessel regression.

[0079] An investigation was undertaken to determine the effects of systemic treatment with Dll4-Fc on hyperoxia-induced blood vessel regression.

[0080] 4.1 mcg of hDll4-hFc or 5 mcg of human hFc control protein was injected intravitreally (ITV) or hDll4-hFc was injected intraperitoneally at a dose of 25 mg per kg of the body weight at P7. Pups were placed into a 75% oxygen environment at P8 and retinal vasculature was analyzed at P9. All other procedures were performed as described above.

[0081] Results. Both local (intravitreal) and systemic (intraperitoneal) administration of Dll4-Fc reduced areas of obliterating vasculature by 86% and 56% respectively, indicating that independently of the route of administration Dll4 inhibitors can be effectively used to protect blood vessels from regression (Fig. 10).

1926

What is claimed is:

1. Use of an agent capable of inhibiting Dll4 activity in the manufacture of a medicament for treating, inhibiting or ameliorating an ischemic or vascular disorder, wherein the Dll4 antagonist comprises an antibody or antibody fragment capable of blocking the binding of Dll4 to a Notch receptor or comprises a fragment of Dll4, optionally connected to a multimerizing component.
2. Use according to claim 1, wherein the Dll4 antibody or antibody fragment is polyclonal or monoclonal.
3. Use according to claim 2, wherein the antibody or antibody fragment is humanized, chimeric, or is a fully human antibody or antibody fragment.
4. Use according to any one of claims 1 to 3, wherein ischemic or vascular disorder is an eye disease or condition is characterized by the presence of abnormal blood vessels and/or loss of normal blood vessels or vessel function.
5. Use according to claim 4, wherein the eye disease is retinopathy of prematurity, ischemic retinopathy, retinal vein or artery occlusion, diabetic retinopathy, choroidal neovascularization, age related macular degeneration, corneal neovascularization, neovascular glaucoma or corneal transplantation.
6. Use according to any one of claims 1 to 5, wherein the subject treated is a human being.
7. Use according to any one of claims 1 to 3, wherein the ischemic or vascular disorder is ischemic injury, cerebral ischemia, cardiac ischemia, ischemic conditions affecting the limbs and other organs or tissues, arteriovenous malformations, wound healing, organ or tissue transplantation, placental insufficiency, arterial narrowing and occlusion, atherosclerosis, and systemic or pulmonary hypertension.

20
27

1/10

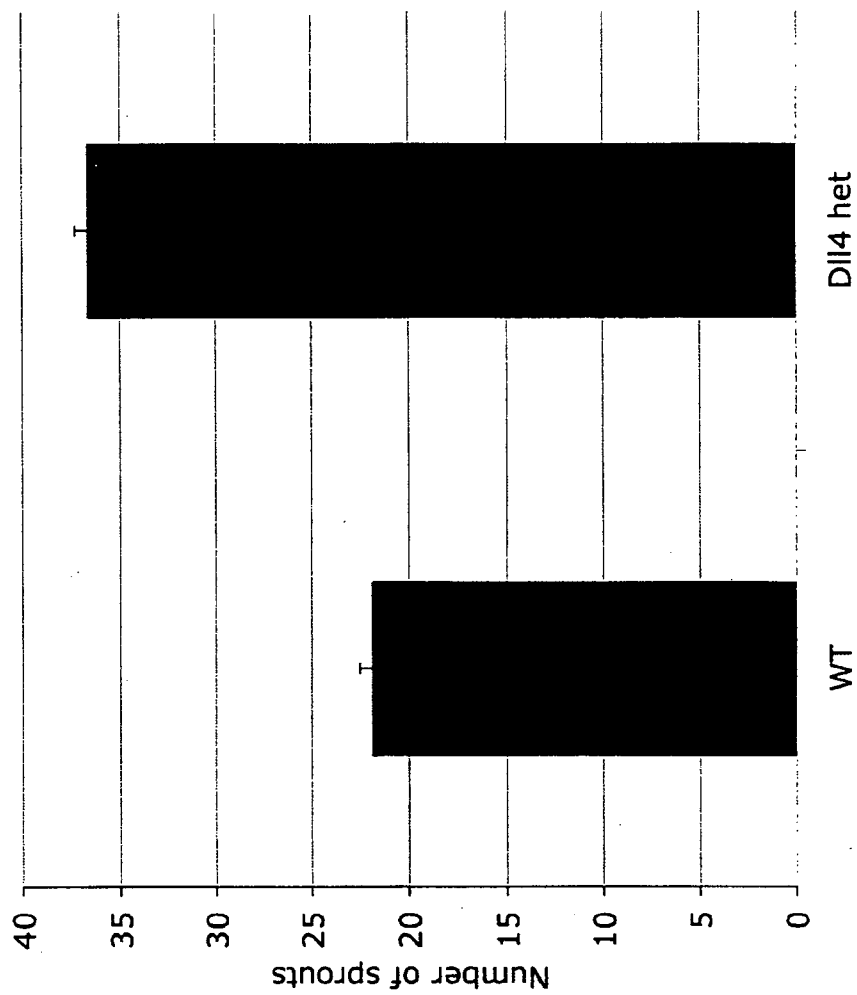


Fig. 1

82/28

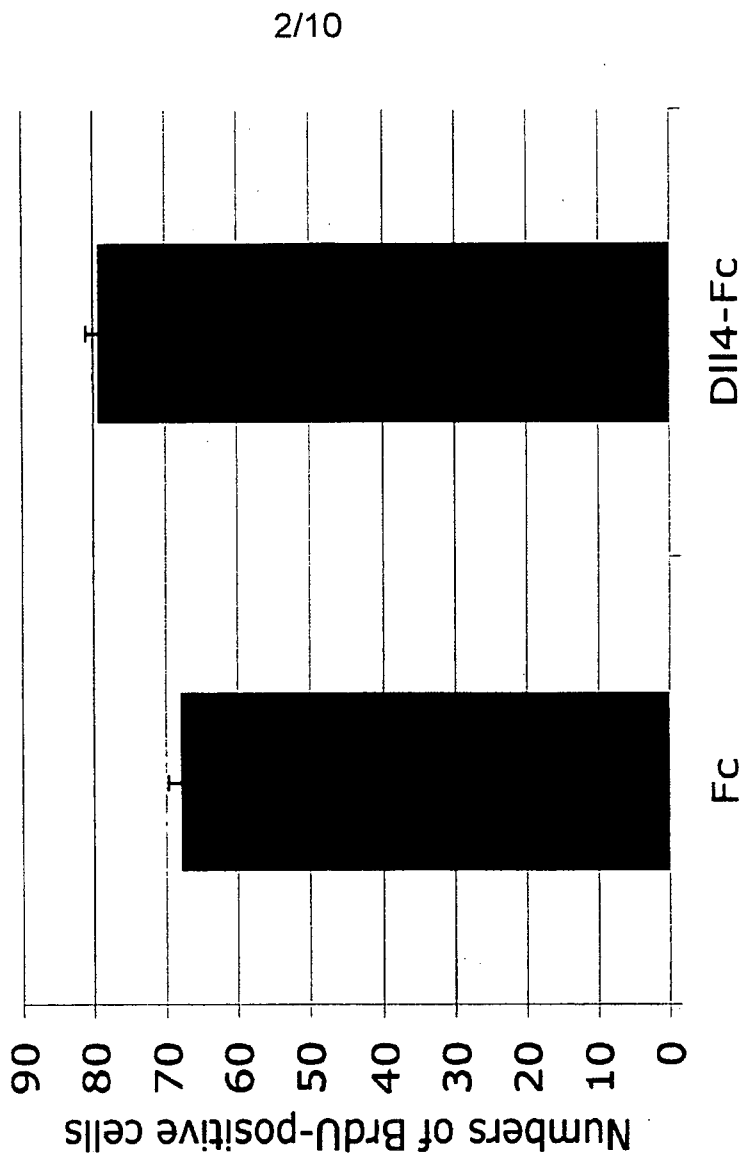


Fig. 2

22
29

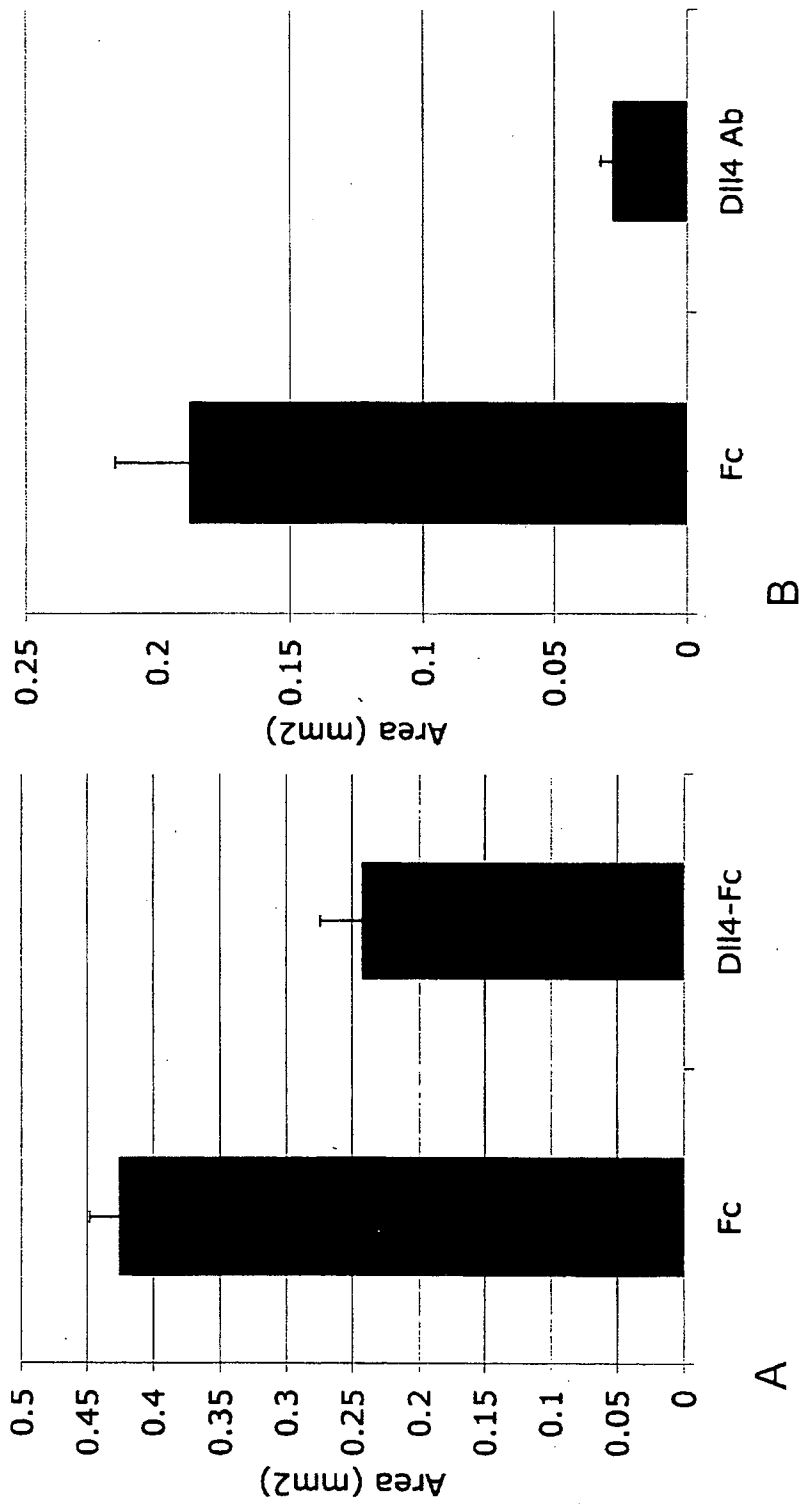


Fig. 3

[Handwritten signature]

4/10

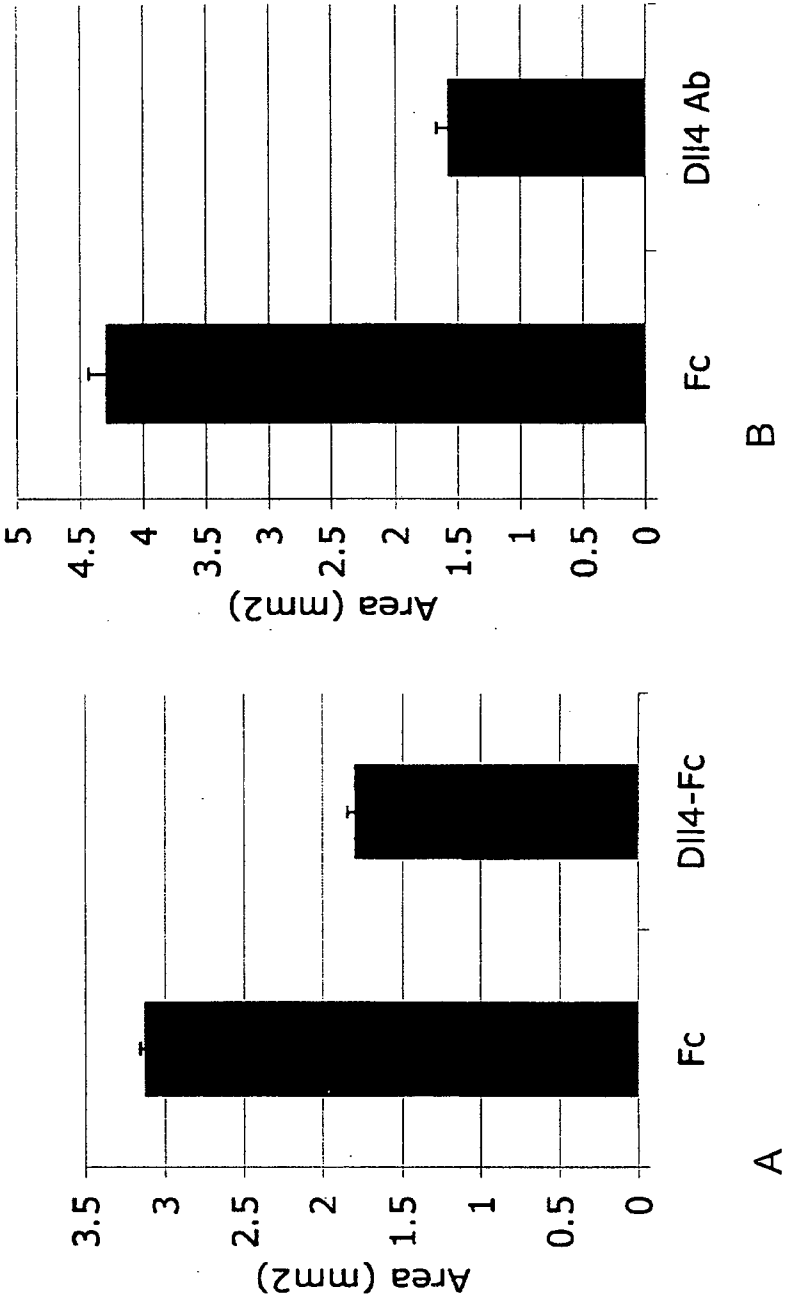


Fig. 4

2A
31

5/10

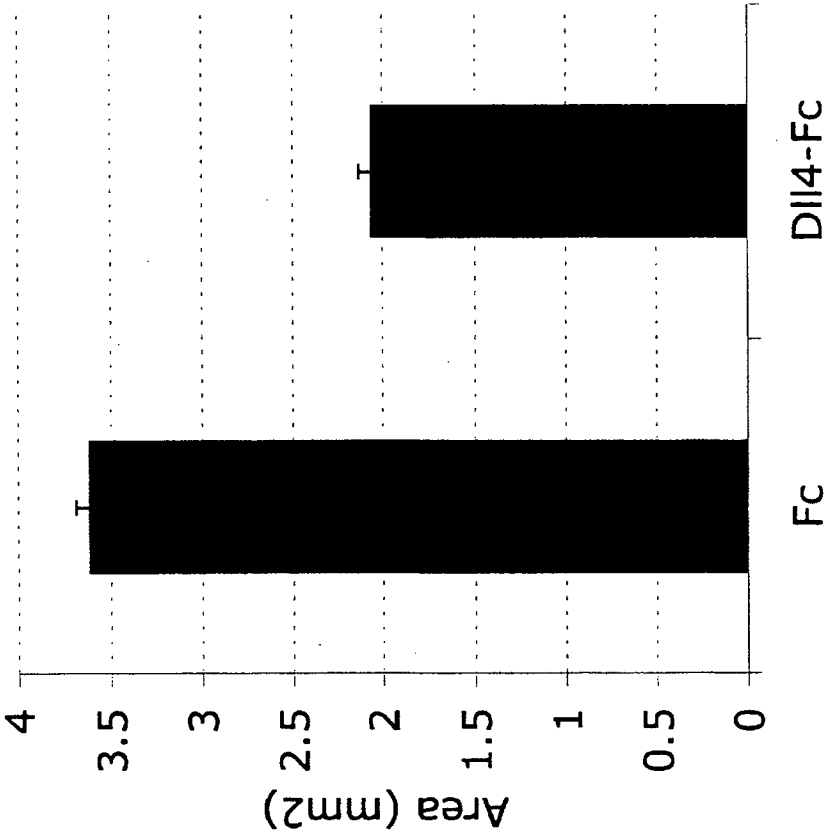


Fig. 5

28-
32

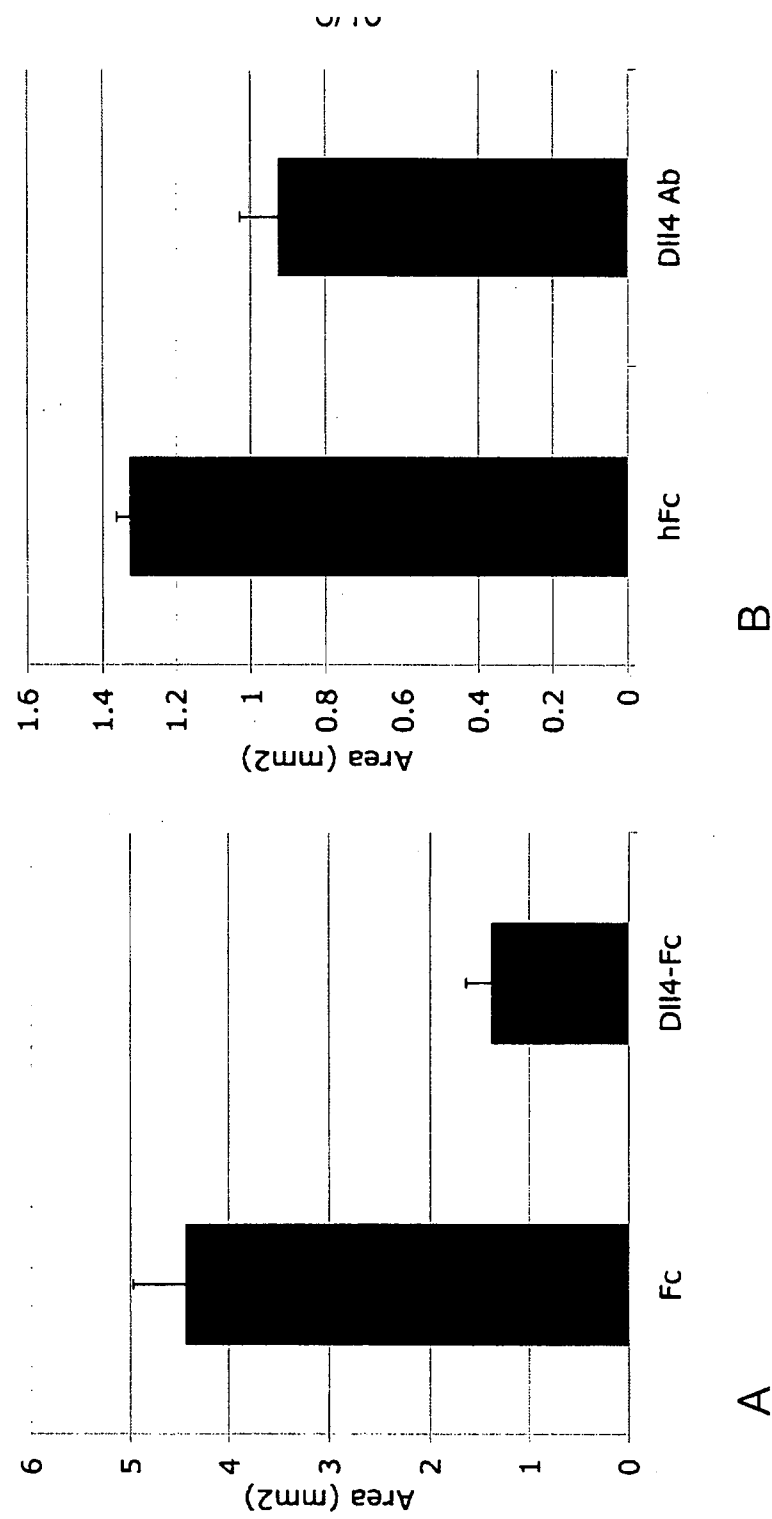


Fig. 6

2633

7/10

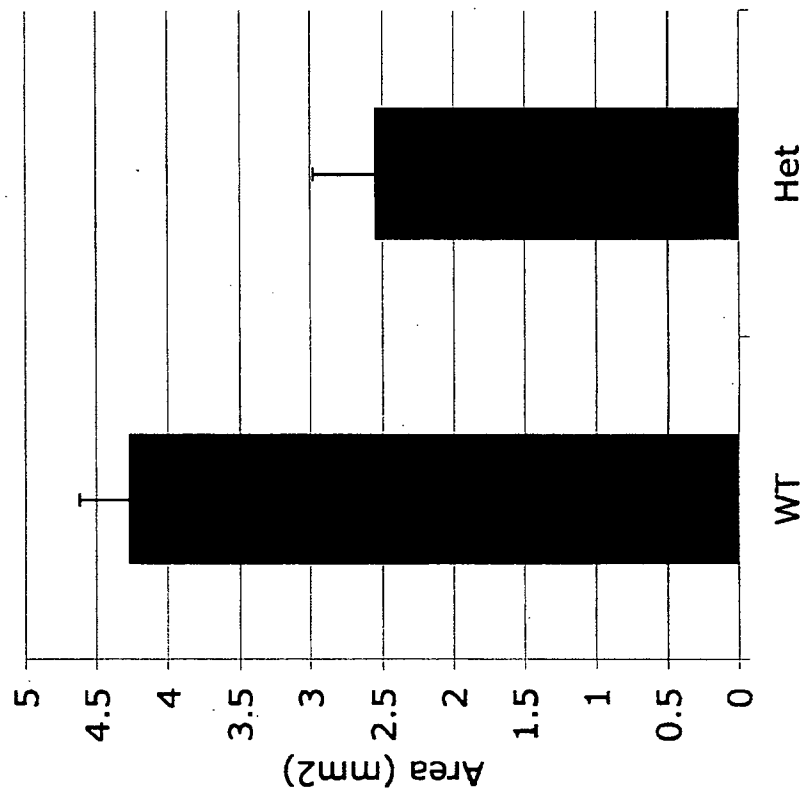


Fig. 7

27
34

8/10

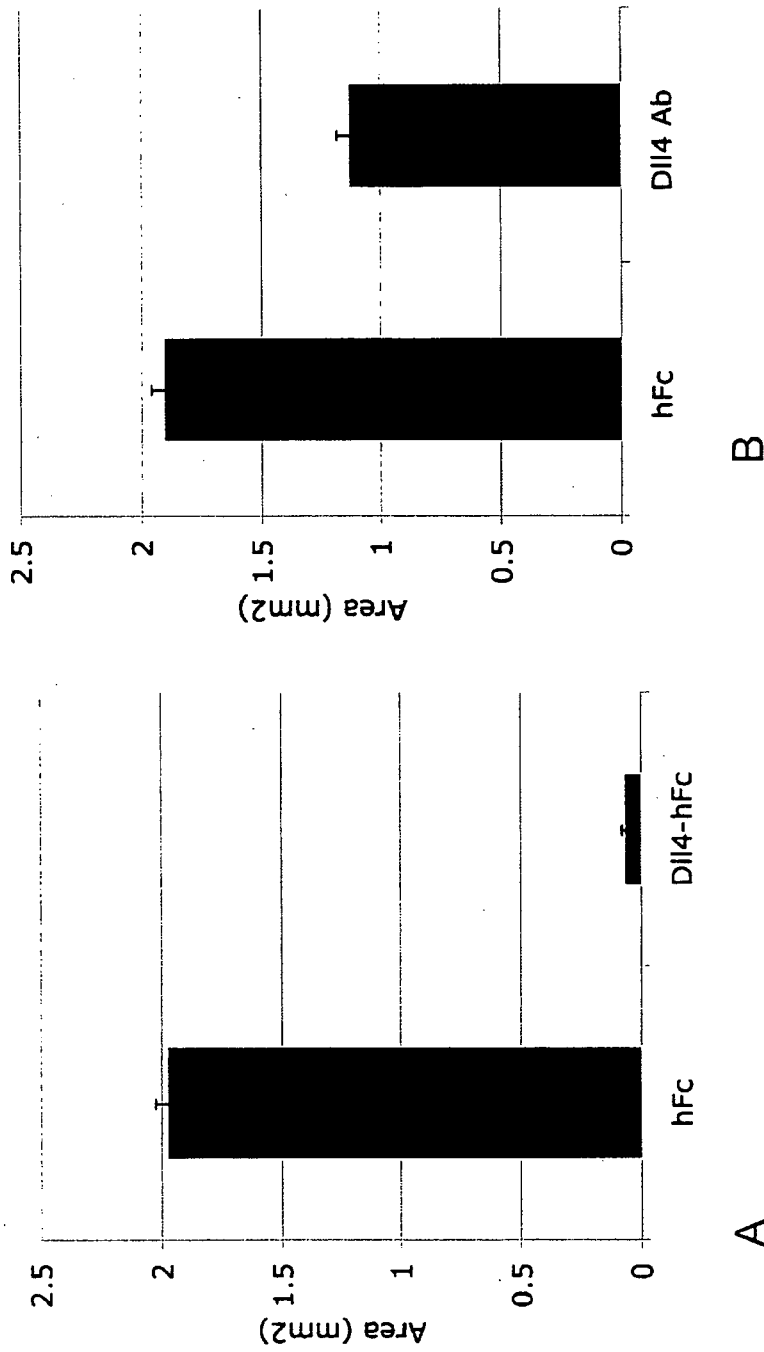


Fig. 8.

28
35

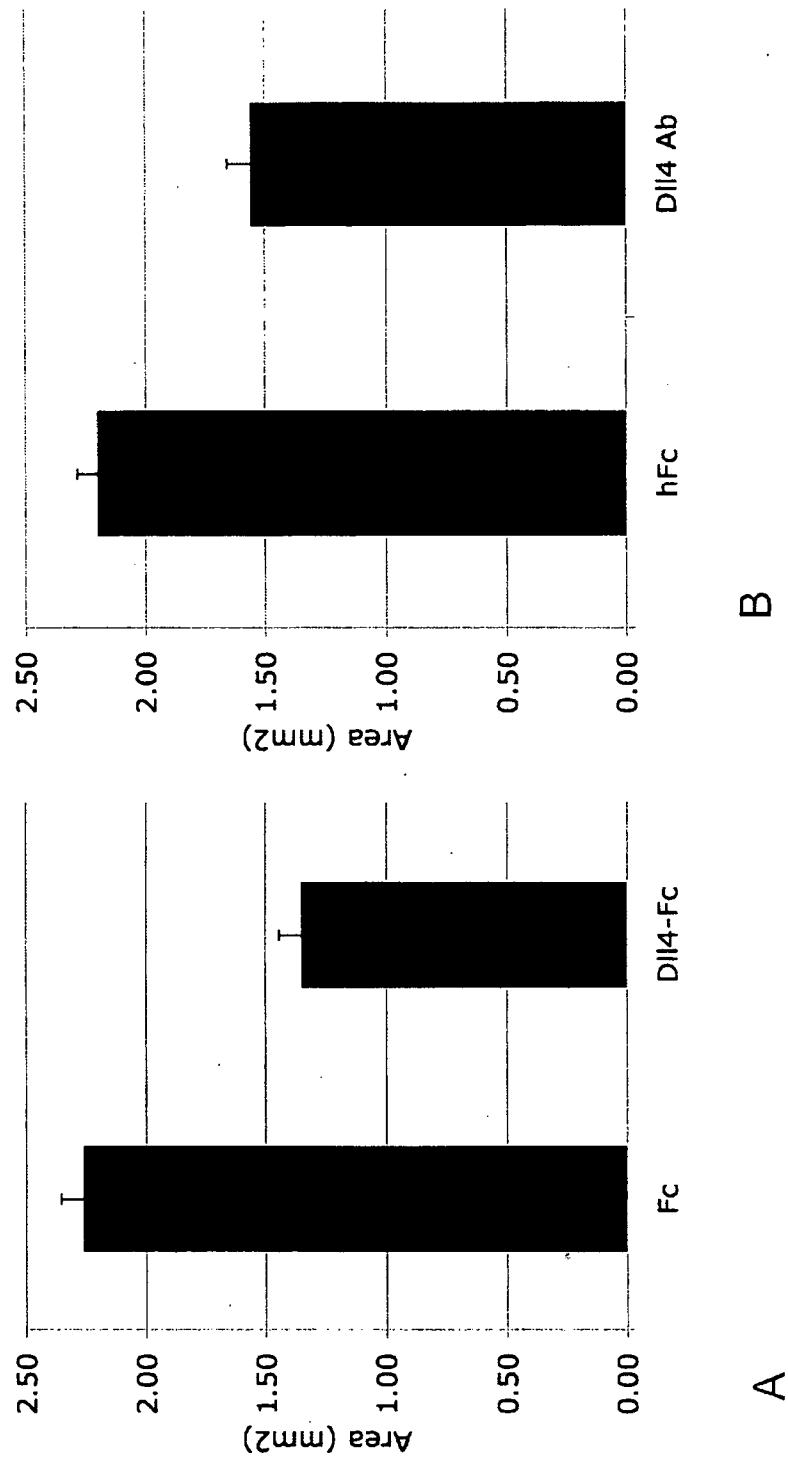


Fig. 9

29
36

10/10

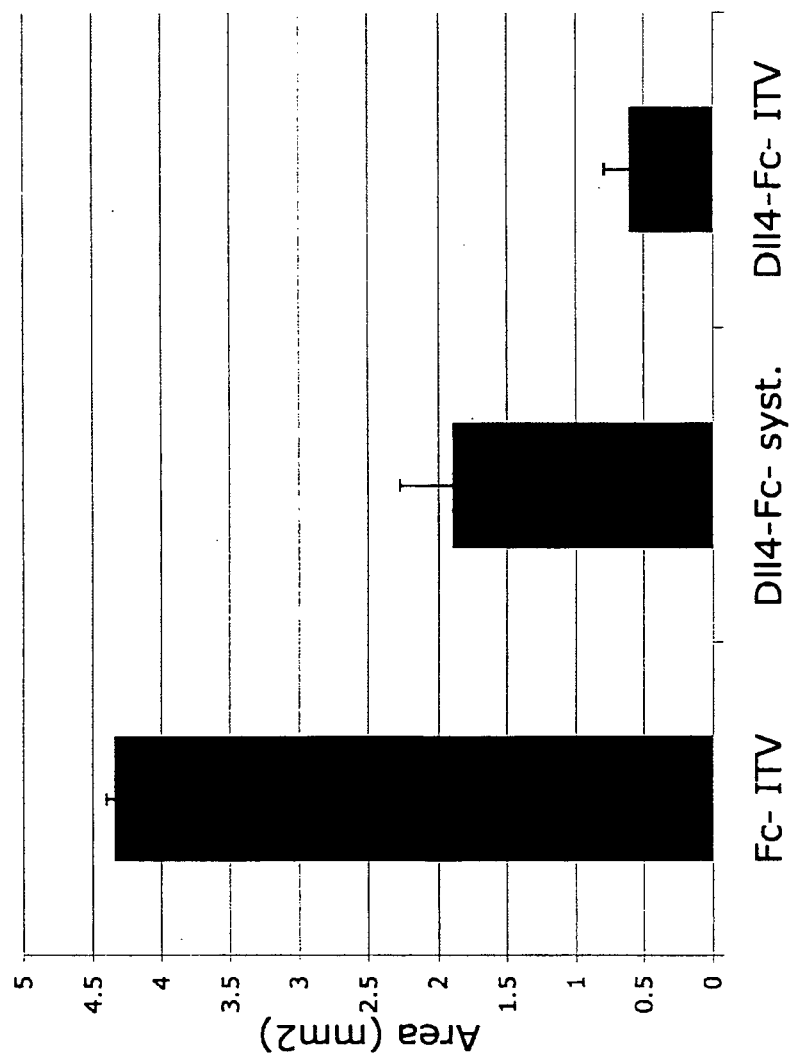


Fig. 10.

30
37

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc

<120> Therapeutic Methods for Treating Vascular Eye Disorders with DLL4 Antagonists

<130> 3090A-WO

<140> To be assigned

<141> 2007-08-07

<150> 60/836,003

<151> 2006-08-07

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2058

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

```
atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcacttttg 60
cagcagcgcg cggccggctc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagt catcaacgag 120
cgcggcgctac tggccagtgg gcggccttgc gagcccgct gccggacttt cttccgcgtc 180
tgccttaagc acttccaggc ggtcgtctcg ccgagaccct gcaccttcgg gaccgtctcc 240
acgcccgtat tgggcaccaa ctccctcgt gtccgggacg acagttagcg cggggggcgc 300
aaccctctcc aactgcctt caatttcacc tggccgggta cctctcgt catcatcgaa 360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc 420
agcaagatcg ccattccagg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagacccc tcacaaggct gcgtactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540
ggagacaact gctcccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc 600
cagccagatg gcaacttgct ctgcctgccc ggttggaact ggggaatatt ccaacagcct 660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc 720
tgccgcccag gctggcaggg ccggtgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc 780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtatg agggctgggg aggcctgttt 840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactcccat gcaagaatgg ggcaacgtgc 900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgtggac 960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaa 1020
gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa 1080
cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcttcaatg ggggctcctg ccgggagcgc 1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact tcaccggctc caactgagag 1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagt cctgaaccga 1260
ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac 1320
gtcagcgact gtgccgtaa cccttgccgc caggtgggca cttgccatga cctggagaat 1380
gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc 1440
atcgatgcct gtgcctcgag tccctgcttc aacagggcca cctgtacac cgacctctcc 1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccctat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc 1560
gtgggcttgc cgcacagctt ccctgggtg gcgtctcgc tgggtgtggg gctggcagt 1620
ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagt gctgtgcggc agctgcggct tcgacggccg 1680
gacgacggca gcagggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt 1740
cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaaagtga ctgtggcctg 1800
gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccagg 1860
cccctggggc gggggacat gccaggaaag ttccccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcggcac tgcggttaca cagtgaagg ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
cccagggact ccattgacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
attgccacgg aggtataa 2058
```

3138

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc

<120> Therapeutic Methods for Treating Vascular Eye Disorders with DLL4 Antagonists

<130> 3090A-WO

<140> To be assigned

<141> 2007-08-07

<150> 60/836,003

<151> 2006-08-07

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2058

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

atggcggcag	cgccccggag	cgccctctggc	tgggcgctac	tgctgctggt	ggcacttttg	60
cagcagcgcg	cgggcggctc	cggcgtcttc	cagctgcagc	tgaggaggtt	catcaacgag	120
cgcgcgctac	tgccagtggt	gcggccttgc	gagcccggt	gccggacttt	cttcgcgctc	180
tgcccttaagc	acttccaggc	ggctgctctcg	cccggaccct	gcaccttcgg	gaccgtctcc	240
acgccggtat	tgggcaccaa	ctccttcgct	gtccgggacg	acagtagcgg	cggggggcgc	300
aacctctctcc	aactgccctt	caatttcacc	tgcccggtta	ccttctcgct	catcatcgaa	360
gcttggcacg	cgccaggaga	cgacctgcgg	ccaggggcct	tgccaccaga	tgactcatc	420
agcaagatcg	ccatccaggg	ctccctagct	gtgggtcaga	actggttatt	ggatgagcaa	480
accagcaccc	tcacaaggct	gcgctactct	taccgggtca	tctgcagtga	caactactat	540
ggagacaact	gctcccgcct	gtgcaagaag	cgcaatgacc	acttcggcca	ctatgtgtgc	600
cagccagatg	gcaacttgtc	ctgcctgccc	ggctggactg	gggaatattg	ccaacagcct	660
atctgtcttt	cggtctgtca	tgaacagaat	ggctactgca	gcaagccagc	agagtgcctc	720
tgccgcccag	gctggcaggg	ccggctgtgt	aacgaatgca	tccccacaa	tggtgtgtgc	780
cacggcacct	gcagcactcc	ctggcaatgt	acttgtgatg	agggctgggg	aggcctgttt	840
tgtgaccaag	atctcaacta	ctgcacccac	cactccccat	gcaagaatgg	ggcaacgtgc	900
tccaacagtg	ggcagcgaag	ctacacctgc	acctgtcgcc	caggctacac	tggtgtggac	960
tgtgagctgg	agctcagcga	gtgtgacagc	aacccctgtc	gcaatggagg	cagctgtaag	1020
gaccaggagg	atggctacca	ctgcctgtgt	cctccgggct	actatggcct	gcattgtgaa	1080
cacagcacct	tgagctgctc	cgactcccc	tgcttcaatg	ggggctcctg	ccgggagcgc	1140
aaccaggggg	ccaactatgc	ttgtgaatgt	cccccaact	tcaccggctc	caactgcgag	1200
aagaaagtgg	acaggtgcac	cagcaacccc	tgtgccaacg	ggggacagtg	cctgaaccga	1260
ggtccaagcc	gcatgtgccc	ctgccgtcct	ggattcacgg	gcacctactg	tgaactccac	1320
gtcagcgact	gtgcccgtaa	cccttgcgcc	cacggtggca	cttgccatga	cctggagaat	1380
gggtctcatgt	gcacctgccc	tgccggcttc	tctggccgac	gctgtgaggt	gcggacatcc	1440
atcgatgcct	gtgcctcgag	tccctgcttc	aacagggcca	cctgctacac	cgacctctcc	1500
acagacacct	ttgtgtgcaa	ctgccccttat	ggctttgtgg	gcagccgctg	cgagttcccc	1560
gtgggcttgc	cgcccagctt	ccccctgggtg	gccgtctcgc	tggtgtgggg	gctggcagtg	1620
ctgtgtgtac	tgctgggcat	ggtggcagtg	gctgtgcggc	agctgcggct	tcgacggccg	1680
gacgacggca	gcagggaagc	catgaacaac	ttgtcggact	tccagaagga	caacctgatt	1740
cctgccgccc	agcttaaaaa	cacaaaccag	aagaaggagc	tggaagtgga	ctgtggccctg	1800
gacaagtcca	actgtggcaa	acagcaaaac	cacacattgg	actataatct	ggccccaggg	1860
ccccctggggc	gggggacccat	gccaggaaaag	tttccccaca	gtgacaagag	cttaggagag	1920
aaggcgccac	tgcggttaca	cagtgaaaaag	ccagagtgtc	ggatatcagc	gatagtctcc	1980
cccagggact	ccatgtacca	gtctgtgtgt	ttgatatcag	aggagaggaa	tgaatgtgtc	2040
attgccacgg	aggtataa					2058

32
39

<210> 2
<211> 685
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 2
Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
50 55 60
Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
65 70 75 80
Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
85 90 95
Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
100 105 110
Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
115 120 125
Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
130 135 140
Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
145 150 155 160
Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
165 170 175
Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
180 185 190
Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
195 200 205
Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
210 215 220
Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
225 230 235 240
Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
245 250 255
Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
260 265 270
Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
275 280 285
Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
290 295 300
Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
305 310 315 320
Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
325 330 335
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
340 345 350
Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
355 360 365
Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
370 375 380
Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
385 390 395 400
Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
405 410 415
Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
420 425 430

33
40

Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
435 440 445
Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
450 455 460
Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
465 470 475 480
Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
485 490 495
Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
500 505 510
Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
515 520 525
Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
530 535 540
Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
545 550 555 560
Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
565 570 575
Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
580 585 590
Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
595 600 605
Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
610 615 620
Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
625 630 635 640
Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
645 650 655
Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
660 665 670
Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
675 680 685

<210> 3
<211> 3427
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 3
ctcgcaggct aggaaccgga ggccaagagc tgcagccaaa gtcacttggg tgcagtgtac 60
tccctcacta gcccgctcga gaccctagga tttgctccag gacacgtact tagagcagcc 120
accgcccagt cgccctcacc tggattacct accgaggcat cgagcagcgg agtttttgag 180
aaggcgacaa gggagcagcg tcccgaaggg aatcagcttt tcaggaactc ggctggcaga 240
cgggacttgc gggagagcga catccctaac aagcagattc ggagtcccgg agtggagagg 300
acaccccaag ggatgacgcc tgcgtcccgg agcgcctgtc gctgggcgct actgctgtcg 360
gcggtactgt ggccgcagca gcgcgtgcg ggctccggca tcttcagct gcggtgcag 420
gagttcgtca accagcgcgg tatgctggcc aatgggcagt cctgcgaacc gggctgccgg 480
actttcttcc gcatttgctt taagcacttc caggcaacct tctccgaggg accctgcacc 540
tttggaatg tctccacgcc ggtattgggc accaactcct tcgctcgtcag ggacaagaat 600
agcggcagtg gtgcgaaccc tctgcagttg ccttcaatt tcacctggcc gggaaccttc 660
tcaactcaaca tccaagcttg gcacacaccg ggagacgacc tgcggccaga gacttcgcca 720
ggaaactctc tcatcagcca aatcatcatc caaggctctc ttgctgtggg taagatttgg 780
cgaacagacg agcaaaatga caccctcacc agactgagct actcttaccg ggtcatctgc 840
agtgacaact actatggaga gagctgttct cgcctatgca agaagcgcga tgaccacttc 900
ggacattatg agtgccagcc agatggcagc ctgtcctgcc tgccgggctg gactgggaag 960
tactgtgacc agcctatatg tctttctggc tgtcatgagc agaatggtta ctgcagcaag 1020
ccagatgagt gcatctgcgg tccaggttgg cagggtcgcc tgtgcaatga atgtatcccc 1080
cacaatggct gtcgtcatgg cacctgcagc atcccctggc agtgtgcctg cgatgaggga 1140
tggggaggtc tgttttgtga ccaagatctc aactactgta ctcaccactc tccgtgcaag 1200
aatggatcaa cgtgttccaa cagtgggcca aagggttata cctgcacctg tctcccaggc 1260

34
A1

PCT/US2007/017546

Printed: 09/24/2007

8:00:51

09/24/2007

```
tacactggtg agcactgtga gctgggactc agcaagtgtg ccagcaaccc ctgtcgaaat 1320
ggtggcagct gtaaggacca ggagaatagc taccactgcc tgtgtccccc aggctactat 1380
ggccagcact gtgagcatag taccttgacc tgtgcggact caccctgctt caatgggggc 1440
tcttgccggg agcgcaacca ggggtccagt tatgcctgcg aatgcccccc caactttacc 1500
ggctctaact gtgagaagaa agtagacagg tgtaccagca acccgtgtgc caatggaggc 1560
cagtgcctga acagaggtcc aagccgaacc tgccgctgcc ggcttgattt cacaggcacc 1620
cactgtgaac tgcacatcag cgattgtgcc cgaagtccct gtgccacagg gggcacttgc 1680
cacgatctgg agaatgggcc tgtgtgcacc tgcccgcgtg gcttctctgg caggcgctgc 1740
gaggtgcgga taaccacaga tgccctgtgcc tccggaccct gcttcaatgg ggccacctgc 1800
tacactggcc tctcccaaaa caacttcgtc tgcaactgtc cttatggctt tgtgggcagc 1860
cgctgcgagt ttcccgtagg cttgccaccc agcttcccct gggtagctgt ctogctgggc 1920
gtggggctag tggtagtgcg ggtgctgctg gtcattggtg tagtggctgt gcggcagctg 1980
cggcttcgga ggcccgatga cgagagcagg gaagccatga acaatctgtc agacttccag 2040
aaggacaacc taatccctgc cgcccagctc aaaaacacaa accagaagaa ggagctggaa 2100
gtggactgtg gtctggacaa gtccaattgt ggcaaaactg agaaccacac attggactac 2160
aatctagccc cgggactcct aggacggggc agcatgcctg ggaagtatcc tcacagtgc 2220
aagagcttag gagagaaggt gccacttcgg ttacacagtg agaagccaga gtgtcgaaata 2280
tcagccattt gctctcccag ggactctatg taccaatcag tgtgtttgat atcagaagag 2340
aggaacgagt gtgtgattgc cacagaggta taaggcagga gcctactcag acaccagct 2400
ccggcccagc agctgggcct tccttctgca ttgtttacat tgcacctgtg atgggacatc 2460
tttagtatgc acagtgtgc tctgcggagg aggagggaaat ggcatgaact gaacagactg 2520
tgaacccgcc aagagttgca ccggctctgc acacctccag gactctgcct ggcttcagat 2580
gggcagcccc gccaaagggaa cagagttgag gagttagagg agcatcagtt gagctgatat 2640
ctaaggtgcc tctcgaactt ggacttgctc tgccaacagt ggcatcatg gagctcttga 2700
ctgttctcca gagagtggca gtggccctag tgggtcttgg cgctgctgta gctcctgtg 2760
gcatctgtat ttccaaagtg cctttgcccc gactccatcc tcacagctgg gcccaaatga 2820
gaaagcagag aggaggcttg caaaggatag gcctcccga ggcagaacag ccttgagatt 2880
tggcattaag caggagctac tctgcaggtg aggaaagccc gaggagggga cacgtgtgac 2940
tctgcctcc aaccccagca ggtggggtgc cactgcagc ctctaggcaa gagttggtcc 3000
ttccctggt cctggtgcct ctgggctcat gtgaacagat gggcttaggg cagccccctt 3060
ttgccagcca ggggtacagg cctcactggg gagctcaggg ccttcatgct aaactcccaa 3120
taaggagat ggggggaagg gggctgtggc ctaggccctt cctccctca caccatttt 3180
tgggcccctg agcctgggct ccaccagtgc cactgttgcc cccgagacca acctgaagc 3240
cgattttcaa aaatcaataa tatgaggttt tgtttttag tttattttgg aatctagtat 3300
tttgataatt taagaatcag aagcactggc ctttctacat tttataacat ttttttgtat 3360
ataatgtgta ttataatat gaaacagatg tgtacataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3420
aaaaaaa
```

<210> 4
<211> 686
<212> PRT
<213> Homo sapien

```
<400> 4
Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln
20 25 30
Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly
35 40 45
Gln Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys
50 55 60
His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val
65 70 75 80
Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn
85 90 95
Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp
100 105 110
Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp
115 120 125
Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile
```

08/07/2007

35
42

130						135						140							
Ile	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Ile	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu				
145					150					155					160				
Gln	Asn	Asp	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys				
				165					170						175				
Ser	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg				
				180					185						190				
Asp	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser				
		195						200					205						
Cys	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Lys	Tyr	Cys	Asp	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu				
		210				215					220								
Ser	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Asp	Glu	Cys				
225					230					235					240				
Ile	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro				
				245					250						255				
His	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Ile	Pro	Trp	Gln	Cys	Ala				
			260					265					270						
Cys	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr				
		275				280						285							
Cys	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser				
		290				295					300								
Gly	Pro	Lys	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Glu				
305					310					315					320				
His	Cys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Lys	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn				
				325					330						335				
Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asn	Ser	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro				
		340						345					350						
Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gln	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Thr	Cys	Ala				
		355					360					365							
Asp	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly				
		370				375					380								
Ser	Ser	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys				
385					390					395					400				
Glu	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly				
				405					410						415				
Gln	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly				
			420					425						430					
Phe	Thr	Gly	Thr	His	Cys	Glu	Leu	His	Ile	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Ser				
		435					440					445							
Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Pro	Val				
		450				455					460								
Cys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Ile				
465					470					475					480				
Thr	His	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Gly	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys				
				485					490						495				
Tyr	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	Asn	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly				
			500					505					510						
Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe				
		515					520					525							
Pro	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Val				
						535					540								
Leu	Leu	Val	Met	Val	Val	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg				
545					550					555					560				
Pro	Asp	Asp	Glu	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln				
				565					570					575					
Lys	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys				
				580				585						590					
Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys				
		595					600					605							
Leu	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly				
					610		615				620								

36
43

Arg Gly Ser Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
625 630 635 640
Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
645 650 655
Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu
660 665 670
Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
675 680 685

<210> 5
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225

37
44

Métodos terapéuticos para el tratamiento de trastornos oculares vasculares con antagonistas de Dll4

Campo de la Invención

- 5 [0001] Esta invención se refiere en general a métodos para el tratamiento de trastornos vasculares e isquémicos mediante la administración de composiciones que inhiben la interacción de Dll4 con los receptores Notch, y/o la activación de los receptores Notch. Más específicamente, esta invención se refiere a métodos de tratamiento de trastornos vasculares y/o isquémicos oculares mediante la
- 10 administración de composiciones que inhiben la interacción de Dll4 con los receptores Notch.

Antecedentes

- 15 [0002] La angiogénesis es un proceso fundamental necesario para el desarrollo y el crecimiento normal de tejidos y órganos, e implica la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis y la homeostasis de los vasos sanguíneos están bajo un control estricto por medio de un sistema sumamente regulado de moduladores angiogénicos. La desviación de tal control estricto conduce o está asociado a menudo a enfermedades.
- 20 [0003] Aunque la angiogénesis "excesiva" desregulada o anormal es característica de numerosos estados patológicos, la angiogénesis insuficiente, la pérdida de vasos sanguíneos o la oclusión funcional o estructural de vasos sanguíneos puede ser también un problema médico grave. Es deseable estimular la angiogénesis y/o evitar la regresión de los vasos sanguíneos existentes en situaciones en las que el tejido se
- 25 hace isquémico, por ejemplo en la isquemia retiniana, cerebral, cardiovascular y de las extremidades, y en afecciones en las que se debe establecer, restablecer, incrementar o aumentar un aporte vascular, por ejemplo en la cicatrización de heridas y tras el trasplante de tejidos u órganos, o para estimular el establecimiento de vasos colaterales o incrementar de otra manera la perfusión de un tejido u órgano que tiene
- 30 una circulación inadecuada.
- [0004] La ruta de señalización Notch es un sistema para la comunicación entre células usado por una amplia variedad de eucariotas en muchos procesos biológicos, tales como la diferenciación, proliferación y homeostasis (Artavanis-Tsakonas et al. (1999) Science 284:770-776). La señalización Notch se ha implicado también en el
- 35 control del desarrollo vascular (Iso et al. (2003) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23:543-

38
45

553).

[0005] La molécula 4 similar a Delta (Dl4) o ligando 4 similar a delta (Dl4) (en adelante "Dl4") es un miembro de la familia Delta de los ligandos de Notch que exhibe una expresión sumamente selectiva por parte del endotelio vascular (Shutter et al. (2000) Genes Dev. 14:1313-1318). Dl4 es un ligando para los receptores Notch, que incluyen Notch1 y Notch4. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos para Dl4 de humano y de ratón se muestran en ID SEC N°:1-2 e ID SEC N°:3-4, respectivamente. Se han generado ratones con selección del gen de Dl4 (véase, por ejemplo, Duarte et al. (2004) Genes Dev. 18:2474 - 2478; Krebs et al. (2004) Genes Dev. 18:2469 - 2473; Gale et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:15949-15954). Estos estudios demostraron que Dl4 se expresaba en gran medida en los vasos sanguíneos en desarrollo en el embrión de ratón, y que incluso la delección genética de un único alelo de Dl4 daba como resultado la mortalidad embrionaria, asociada a anomalías vasculares notables.

15

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades que afectan al sistema cardiovascular con agentes capaces de bloquear la interacción de Dl4 con sus receptores ("antagonistas de Dl4"). Los resultados experimentales proporcionados en el presente documento apoyan el uso de los antagonistas de Dl4 para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por neovascularización patológica e insuficiencia vascular, en la que la insuficiencia vascular se debe a la pérdida de vasos sanguíneos o a cambios vasculares funcionales que dan como resultado una perfusión tisular insuficiente. Los antagonistas de Dl4 son especialmente útiles para el tratamiento de trastornos vasculares del ojo, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad y otras enfermedades oculares caracterizadas por angiogénesis patológica y/o isquemia retiniana, tal como oclusión venosa o arterial retiniana.

[0007] Se demuestra que la inhibición farmacológica de Dl4 ejerce varios efectos beneficiosos en un modelo de retinopatía isquémica, que incluyen la disminución de la pérdida de vasos sanguíneos cuando se aplica en el momento de una lesión que conduce a la pérdida de vasos sanguíneos, y la inhibición del desarrollo de cambios patológicos en la vasculatura a la vez que se incrementa el recrecimiento de más vasos sanguíneos funcionales normales cuando se aplica tras el establecimiento de la isquemia.

35

[0008] Se espera que los agentes farmacológicos que inhiben la señalización de

Dll4 sean igualmente beneficiosos en el tratamiento de otras formas de lesión isquémica, que incluyen isquemia cerebral, isquemia cardiaca, y afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y a otros órganos o tejidos corporales. También se espera que los inhibidores de Dll4 sean clínicamente beneficiosos en
5 otras afecciones que requieran el establecimiento o el restablecimiento de un aporte vascular, o que se beneficiarían de otra manera de una perfusión tisular incrementada. Los ejemplos de tales afecciones son las malformaciones arteriovenosas, cicatrización de heridas, trasplante de órganos o tejidos, e insuficiencia placentaria. Como se demuestra en el trabajo experimental presentado
10 más adelante, la inhibición de Dll4 evita el estrechamiento y la oclusión arterial, lo que indica que los inhibidores de Dll4 también serían eficaces en el tratamiento de la hipertensión sistémica o pulmonar, y en los trastornos relacionados.

[0009] Se demuestra ahora que los antagonistas de Dll4 son eficaces en la estimulación de una angiogénesis productiva tanto en condiciones normales como
15 patológicas. De forma específica, se demuestra que el bloqueo de la señalización de Dll4-Notch incrementa la formación de brotes angiogénicos y la proliferación de células endoteliales vasculares en la vasculatura retiniana en desarrollo, e inhibe la formación de neovascularización patológica ectópica y el desarrollo de comunicaciones arteriovenosas en favor de una formación de vasos más apropiada en
20 la retina isquémica. Además, se demuestra que la aplicación de bloqueantes de Dll4 en el momento de la lesión del vaso reduce notablemente la pérdida posterior de vasos sanguíneos. Estos hallazgos apoyan el uso de un antagonista de Dll4 en el tratamiento de enfermedades oculares caracterizadas por anormalidades vasculares, especialmente cuando van acompañadas de isquemia y de pérdida de vasos
25 normales. Los ejemplos de tales enfermedades oculares incluyen las retinopatías isquémicas, tales como degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena central de la retina u oclusión de rama venosa retiniana, retinopatía diabética, y retinopatía de la prematuridad.

[0010] En un primer aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento
30 de un trastorno o enfermedad ocular caracterizado por anormalidades vasculares, que comprende administrar un antagonista de Dll4 a un sujeto que lo necesita. El método de la invención estimula el crecimiento de vasos normales funcionales, inhibe el crecimiento de vasos anormales o alterados y evita la regresión patológica de los vasos sanguíneos.

35 **[0011]** En una realización, el antagonista de Dll4 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a Dll4 y bloquea la unión de Dll4 a un receptor

30
47

Notch (por ejemplo, los receptores Notch1 y Notch4). En otra realización, el antagonista de Dll4 de la invención es una proteína o fragmento de proteína que comprende el dominio extracelular de Dll4 o un fragmento del mismo, que en las realizaciones específicas puede estar fusionado a un componente de multimerización y que se une a los receptores Notch sin activarlos, por lo que bloquea la acción del Dll4 endógeno.

[0012] El trastorno o enfermedad ocular tratado mediante el método de la invención es un trastorno de la vasculatura ocular caracterizado por la presencia de vasos anormales y/o por la pérdida de vasos normales o de la función normal de los vasos. En las realizaciones específicas, la afección o trastorno tratado incluye la retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión venosa o arterial retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante de córnea.

[0013] El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo usado en el método de la invención puede ser policlonal o monoclonal, y puede ser humanizado, quimérico, o completamente humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano o un fragmento de anticuerpo monoclonal. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena única, ScFv, un Fab, o un F(ab')₂.

[0014] Cuando el antagonista de Dll4 es una proteína o un fragmento de proteína, el fragmento es preferiblemente el dominio extracelular de Dll4 o un fragmento o fragmento modificado del mismo, y se puede fusionar a un componente de multimerización. El componente de multimerización es preferiblemente un dominio de inmunoglobulina, tal como por ejemplo un dominio Fc, p.ej. un Fc humano (ID SEC N°:5). La proteína puede comprender opcionalmente una secuencia de señalización, que puede ser nativa para la célula, recombinante o sintética.

[0015] En un aspecto más amplio, el método de la invención es útil para tratar cualquier enfermedad o afección isquémica provocada por un aporte sanguíneo insuficiente debido a una pérdida de vasos sanguíneos y/o una perfusión deficiente, por ejemplo lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardiaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y a otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización de heridas, trasplante de órganos o tejidos, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis, e hipertensión sistémica o pulmonar.

[0016] En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un agente capaz de inhibir la actividad de Dll4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento,

ST
48

la inhibición o la mejora de un trastorno isquémico o vascular, en el que el antagonista de Dll4 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de bloquear la unión de Dll4 a un receptor Notch, o un fragmento de Dll4 conectado opcionalmente a un componente de multimerización (tal como un dominio Fc). En una realización, el

5 trastorno isquémico o vascular es una enfermedad o afección ocular caracterizada por la presencia de vasos sanguíneos anormales y/o por la pérdida de vasos sanguíneos normales o de la función de los vasos. La enfermedad ocular es retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión venosa o arterial retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular relacionada con la

10 edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante de córnea.

[0017] En otra realización, el trastorno isquémico o vascular es una lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardíaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y a otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización de heridas, trasplante de órganos o tejidos, insuficiencia placentaria,

15 estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis, o hipertensión sistémica o pulmonar.

[0018] Otros objetos y ventajas se pondrán de manifiesto al leer la descripción detallada que sigue.

BREVE COMPENDIO DE LAS FIGURAS

[0019] Fig. 1. La delección genética de un único alelo de Dll4 incrementó el número

20 de brotes angiogénicos en la vasculatura retiniana en desarrollo. El número de brotes se cuantificó en campos de microscopio de 100X aumentos. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel de $p < 0,00001$.

[0020] Fig. 2. La administración intraocular de Dll4-Fc incrementó el número de células en proliferación BrdU-positivas en la vasculatura retiniana en desarrollo. Se

25 inyectaron de forma intravítrea 4,15 mcg de mDll4-hFc o 5 mcg de proteína de control hFc humana en crías de ratón de 7 días de edad. La vasculatura retiniana se analizó 24 horas más tarde. Se cuantificó el número de células BrdU-positivas en campos de microscopio de 200X aumentos. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel de $p < 0,05$.

[0021] Fig. 3A-B. La administración intraocular de Dll4-Fc o de anticuerpo anti-Dll4 estimula el recrecimiento de vasos retinianos en ratones con retinopatía isquémica inducida por oxígeno (OIR). (A) Se inyectaron 0,48 mcg de mDll4-hFc o 0,5 mcg de

30 proteína de control hFc humana de forma intravítrea en crías con OIR de 13 días de edad (día 13 posnatal, o P13). Se analizó la vasculatura retiniana en P17. (B) Se

35 inyectaron 2,55 mcg de anticuerpo anti-mDll4 policlonal de conejo o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P13. Se analizó la vasculatura retiniana

49
421

en P17. Las áreas avasculares se midieron en preparaciones microscópicas retinianas. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles de $p < 0,0001$ (A) y $p < 0,05$ (B).

[0022] Fig. 4A-B. La administración intraocular de Dll4-Fc o de anticuerpo anti-Dll4 mejora la formación de la neovascularización patológica en OIR. (A) Se inyectaron 0,48 mcg de mDll4-hFc o 0,5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P13. Se analizó la vasculatura retiniana en P17. (B) Se inyectaron 2,55 mcg de anticuerpo anti-mDll4 policlonal de conejo o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P13. Se analizó la vasculatura retiniana en P17. Se midieron las áreas vasculares anormales (áreas que contienen "penachos" vasculares ectópicos) en preparaciones microscópicas retinianas. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles de $p < 0,0001$ (A) y $p < 0,05$ (B).

[0023] Fig. 5. La administración intraocular de Dll4-Fc mejora la perfusión retiniana. Se inyectaron 0,48 mcg de mDll4-hFc o 0,5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P13. En P17 los animales se perfundieron con lectina de tomate marcada con rojo Texas y se analizó la vasculatura retiniana en P17. Se midieron las áreas vasculares sin perfundir en preparaciones microscópicas retinianas. Los resultados fueron significativos en el nivel de $p < 0,0005$.

[0024] Fig. 6A-B. La administración intraocular de Dll4-Fc o de anticuerpo anti-Dll4 reduce la hipoxia/isquemia retiniana. (A) Se inyectaron 4,1 mcg de hDll4-hFc o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P12. Se inyectó Hypoxyprobe™-1 de forma intraperitoneal una hora antes de sacrificar a los animales. Se analizó la vasculatura retiniana en P17. Se midieron las áreas marcadas con Hypoxyprobe en preparaciones microscópicas retinianas. (B) Se inyectaron 2,55 mcg de anticuerpo anti-mDll4 policlonal de conejo o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P13. Se inyectó Hypoxyprobe™-1 de forma intraperitoneal una hora antes de sacrificar a los animales. Se analizó la vasculatura retiniana en P17. Se midieron las áreas marcadas con Hypoxyprobe en preparaciones microscópicas retinianas. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles de $p < 0,001$ (A) y $p < 0,05$ (B).

[0025] Fig. 7. La delección genética de un único alelo de Dll4 reduce la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la exposición a hiperoxia. Se colocaron ratones Dll4^{+/-lacZ} y ratones de control de TN de la misma camada en la cámara con un 75% de oxígeno en P7. Se analizó la vasculatura retiniana en preparaciones microscópicas en P12. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel de $p < 0,05$.

[0026] Fig. 8A-B. La administración intraocular de Dll4-Fc o de anticuerpo anti-Dll4

AB
SO

reduce o evita la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la exposición a hiperoxia.

(A) Se inyectaron 4,1 mcg de hDII4-hFc o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P8. Las crías se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno en P9. Se analizó la vasculatura de la retina en P10. (B) Se inyectaron 2,55 mcg de anticuerpo anti-mDII4 policlonal de conejo o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P8. Las crías se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno en P9. Se analizó la vasculatura retiniana en P10. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles de $p < 0,00001$ (A) y $p < 0,0001$ (B).

[0027] Fig. 9A-B. La administración intraocular de DII4-Fc o de anticuerpo anti-DII4 reduce la oclusión de los vasos retinianos. (A) Se inyectaron 4,1 mcg de hDII4-hFc o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P8. Las crías se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno en P9. Las crías se perfundieron con lectina fluorescente y se analizó la vasculatura retiniana en P10. (B) Se inyectaron 2,55 mcg de anticuerpo anti-mDII4 policlonal de conejo o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea en P8. Las crías se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno en P9. Las crías se perfundieron con lectina fluorescente y se analizó la vasculatura retiniana en P10. Los resultados fueron significativamente diferentes en los niveles de $p < 0,00001$ (A) y $p < 0,0001$ (B).

[0028] Fig. 10. La administración sistémica de DII4-Fc reduce o evita la pérdida de vasos sanguíneos retinianos.

Se inyectaron 4.1 mcg de hDII4-hFc o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea (ITV), o se inyectó hDII4-hFc de forma intraperitoneal a una dosis de 25 mg por kg de peso corporal en P7. Las crías se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno en P8. Se analizó la vasculatura retiniana en P9. Los resultados fueron significativamente diferentes en el nivel de $p < 0,0001$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0029] Antes de describir los presentes métodos, se entenderá que esta invención no se limita a métodos y condiciones experimentales particulares, ya que tales métodos y condiciones experimentales pueden variar. Se entenderá también que la terminología empleada en el presente documento sólo tiene como finalidad la descripción de realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, puesto que el alcance de la presente invención sólo está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

[0030] A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que un especialista

51

habitual en la técnica a la que pertenece esta invención entiende comúnmente. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares a los descritos en el presente documento en la práctica o en la evaluación de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

5

Definiciones

[0031] La frase "antagonista de Dll4" significa un agente capaz de inhibir la actividad biológica de Dll4 bloqueando la interacción de Dll4 con sus receptores. La inhibición de la actividad de Dll4 puede darse a través de la inhibición de la activación del receptor con un anticuerpo hacia Dll4 o con un análogo o fragmento de Dll4 que se une pero no activa el receptor (unión no productiva). Los inhibidores habituales incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, receptores solubles, aptámeros oligonucleotídicos, péptidos u otros antagonistas en forma de moléculas pequeñas y sus derivados, y ligandos Dll4 modificados que se unen a su receptor Notch pero que son incapaces de activar la señalización por medio de tal unión. Otras aproximaciones incluyen la interferencia con la expresión del gen que codifica Dll4 o el bloqueo de la activación del receptor Notch, por ejemplo con siARNs o inhibidores de la gamma secretasa, respectivamente.

[0032] Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante" pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a Dll4 da como resultado la inhibición de la actividad biológica de Dll4. Esta inhibición de la actividad biológica de Dll4 se puede determinar midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de Dll4. Estos indicadores de la actividad biológica de Dll4 se pueden determinar mediante uno o más de diversos ensayos *in vitro* o *in vivo* habituales conocidos en la técnica (véanse los ejemplos más adelante). Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad de Dll4 se termina mediante la inhibición de la unión de Dll4 a un receptor Notch, tal como Notch1 y Notch4.

Descripción General

[0033] Las rutas de señalización por medio de Notch están conservadas evolutivamente, y desempeñan papeles clave en la determinación del destino de la célula y en la diferenciación en muchos tejidos durante el desarrollo embrionario y posnatal. Los componentes principales de la ruta Notch se expresan en la vasculatura, y la delección genética de ciertos componentes de la ruta Notch, que incluyen Notch1, Notch1/Notch4, Jagged1, Dll1, Dll4, Hey1/Hey2 o presenilinas, da como resultado una mortalidad embrionaria asociada a defectos en la remodelación vascular. Aunque la

45
51

mayoría de estos genes se expresan en múltiples tejidos y tipos de células, Dll4 está limitado en gran medida al endotelio vascular, lo que sugiere que Dll4 es un ligando clave para los receptores Notch de la vasculatura.

5 [0034] Durante el desarrollo embrionario temprano, incluso la delección genética de un único alelo de Dll4 produce anomalías vasculares graves que dan como resultado la mortalidad embrionaria en la mayoría de variedades de ratones. De hecho, entre los muchos genes implicados en la vasculogénesis y la angiogénesis, se ha informado que la insuficiencia haploide da como resultado defectos vasculares importantes y mortalidad embrionaria solamente para Dll4 y VEGF-A. La mortalidad 10 embrionaria temprana impide la mayoría de manipulaciones experimentales, lo que hace difícil entender de manera precisa el papel de Dll4 durante el desarrollo vascular y en condiciones patológicas.

[0035] Para superar esta limitación, se estudió el efecto de la delección del gen de Dll4 en ratones de la variedad ICR, en los que la haploinsuficiencia produce solamente 15 una mortalidad embrionaria limitada. El fenotipo vascular observado en estos ratones mutantes se comparó con el obtenido en ratones de tipo natural en los que la señalización Dll4/Notch se inhibió de manera selectiva mediante la inyección intravítrea de un inhibidor soluble de Dll4, Dll4-Fc, o un anticuerpo policlonal neutralizante contra el dominio extracelular de Dll4. Para estos experimentos, se 20 seleccionó la retina como un sistema modelo en el que estudiar la biología de Dll4, porque la vasculatura retiniana se desarrolla de forma posnatal de una manera estereotípica que está sumamente organizada, temporal y espacialmente.

[0036] El modelo murino de retinopatía isquémica inducida por oxígeno (OIR) es un modelo bien caracterizado de neovascularización patológica asociada a la expresión 25 elevada del factor proangiogénico esencial, VEGF (Smith et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 35:101-111; Neely et al. 1998 Am J. Pathol 153:665-670; Saint-Geniez et al. 2004 Int J Dev Biol 48:1045-1058), y así es relevante para la angiogénesis patológica asociada a diversas afecciones (Ferrara et al. 2005 Nature 438:967-974). Finalmente, la vasculatura retiniana es fácilmente accesible para las 30 manipulaciones experimentales, que incluyen las microinyecciones intravítreas de los agentes experimentales.

[0037] Los experimentos descritos más adelante demuestran que durante el desarrollo vascular retiniano normal, y en el modelo de OIR, la inhibición farmacológica de la señalización Dll4/Notch aumenta notablemente la formación de 35 brotes angiogénicos y estimula la formación de una red primaria de capilares más densa. De forma coherente con esto, se descubrió que la expresión endógena de Dll4

46 32

es particularmente prominente en la mayoría de regiones activas del crecimiento vascular tanto durante el desarrollo normal como en el modelo de OIR. Además, la inhibición de Dll4 redujo notablemente la formación de la vasculatura anormal y evitó la oclusión y la regresión de los vasos sanguíneos.

5

Antagonistas de Dll4

[0038] Los antagonistas de Dll4 incluyen los anticuerpos hacia Dll4 y los fragmentos de los mismos capaces de bloquear la unión de Dll4 a un receptor Notch, por ejemplo Notch1; y las proteínas o fragmentos de proteínas que comprenden el dominio extracelular de Dll4 que se pueden fusionar a un componente de multimerización; péptidos y peptidocuerpos (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2003/0229023, Oliner et al.).

[0039] Anticuerpos hacia Dll4. La frase "inmunoglobulina o anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido o proteína de mamífero, que incluye humano, que comprende una región estructural de un gen de inmunoglobulina o los fragmentos de la misma que se unen específicamente y reconocen un antígeno, que, en el caso de la presente invención, es una proteína Dll4 o una porción de la misma. Si el anticuerpo o la proteína similar a anticuerpo deseado va a ser usado como un agente terapéutico en mamíferos, las regiones de unión de la inmunoglobulina deberían proceder de las inmunoglobulinas de mamíferos correspondientes. Si la molécula se destina a un uso no terapéutico, tal como a diagnóstico y ELISAs, las regiones de unión de la inmunoglobulina pueden proceder de mamíferos humanos o no humanos, tales como ratones. Los genes de inmunoglobulinas humanas o los fragmentos de genes incluyen las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como la miríada de genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Dentro de cada clase de IgG existen diferentes isotipos (p.ej. IgG₁, IgG₂, etc.), así como los alotipos de los mismos.

[0040] Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar de IgG humana comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena ligera (alrededor de 25 kD) y una cadena pesada (alrededor de 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de alrededor de 100-110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. Las expresiones "cadena

35

453

ligera variable" (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

- [0041] Los anticuerpos existen en forma de inmunoglobulinas intactas, o en forma de varios fragmentos bien caracterizados producidos mediante la digestión con diversas peptidasas. Por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de la bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que es él mismo una cadena ligera unida a V_H-C_H mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región de la bisagra, por lo que se convierte el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'.
- 10 El monómero Fab' es básicamente Fab con parte de la región de la bisagra. Aunque se describen diversos fragmentos de anticuerpos en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar *de novo* químicamente o mediante el uso de la metodología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye
- 15 fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados *de novo* mediante el uso de las metodologías de ADN recombinante, o generados mediante bibliotecas de expresión tales como las bibliotecas de expresión en fagos, *E. coli* o levaduras (véase, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554).
- 20 [0042] Análogos de DII4 o fragmentos de proteína. El antagonista de DII4 puede ser un fragmento de DII4 conectado opcionalmente a un componente de multimerización. En las realizaciones específicas, se puede fusionar un fragmento de DII4 a un componente de multimerización tal como un dominio de inmunoglobulina, un dominio de inmunoglobulina troncada, o una secuencia de aminoácidos de 1 a alrededor de
- 25 500 aminoácidos de longitud, que comprende opcionalmente al menos un residuo de cisteína. En una realización preferida, el componente de multimerización es un dominio de inmunoglobulina, preferiblemente un dominio Fc, p.ej. un Fc humano (ID SEC N°:5). La proteína o el fragmento de proteína puede comprender opcionalmente una secuencia de señalización, que puede comprender cualquier secuencia conocida
- 30 para un técnico experto para dirigir la secreción de un polipéptido o proteína desde una célula, lo que incluye las secuencias naturales o sintéticas. En general, una secuencia de señalización se coloca al comienzo o en el extremo aminoterminal de la proteína de fusión de la invención. Tal secuencia de señalización puede ser nativa para la célula, recombinante o sintética.
- 35 [0043] El dominio extracelular de DII4 está compuesto de un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) y ocho repeticiones en tándem similares al factor de

48
54

crecimiento epidérmico (EGF). En general, se reconoce que los dominios de EGF se dan aproximadamente en las posiciones 218-251 (dominio 1), 252-282 (dominio 2), 284-322 (dominio 3), 324-360 (dominio 4), y 362-400 (dominio 5), con el dominio DSL aproximadamente en la posición 173-217 y el dominio N-terminal aproximadamente en la posición 27-172 de hDII4 (ID SEC N°:2). En las realizaciones específicas, el antagonista de DII4 comprende aproximadamente los aminoácidos 27-172, 27-217, 218-400, 218-360, 218-322, o 218-282 de la ID SEC N°:2, opcionalmente fusionados a hFc (ID SEC N°:5).

10 **Métodos de Administración**

[0044] La invención proporciona métodos de tratamiento que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un agente de la invención a un sujeto. En un aspecto preferido, el agente está sustancialmente purificado (p.ej., sustancialmente exento de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseados). El sujeto es preferiblemente un animal, p.ej., tal como una vaca, cerdo, caballo, pollo, gato, perro, etc., y es preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un humano. En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención de manera local en el área que necesita tratamiento; esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante cirugía, mediante aplicación tópica, p.ej., mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante.

[0045] Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo de manera ventajosa mediante administración en el área que necesita tratamiento mediante administración local, que incluye la administración intravítrea, intraocular, periocular, subconjuntiva, yuxtaescleral, subtenoniana o tópica.

Terapias de Combinación

[0046] En diversas realizaciones, el método de la invención se lleva a cabo con un antagonista de DII4, tal como un anticuerpo hacia DII4, en combinación con uno o más compuestos o terapias o procedimientos médicos adicionales. Por ejemplo, los agentes terapéuticos adecuados para el uso en combinación, de forma alternante o simultánea, incluyen las proteínas de fusión capaces de unirse e inhibir la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (véanse los documentos de EE.UU. 7.070.959 y 7.087.411), agentes inmunosupresores tales como corticoesteroides, dexametasona, ciclosporina A, FK506, o agentes antimetabólicos, (véase Barker, NH, *et al.*, (2000) Clin Exp Opthal 28:357-360). Otros agentes terapéuticos adecuados

49SS

para el uso en combinación, de forma alternante o simultánea, con los antagonistas de Dll4 de la invención pueden incluir agentes que pueden bloquear la actividad biológica de otros miembros de la familia de VEGF tales como VEGF-C y VEGF-D.

5

EJEMPLOS

[0047] Los ejemplos que siguen se ofrecen para proporcionar a los especialistas ordinarios en la técnica una completa divulgación y descripción de cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho
10 esfuerzos para asegurar la exactitud de los valores numéricos empleados (*p.ej.*, cantidades, medidas de área, etc.), pero se ha de contar con algunos errores y desviaciones experimentales.

**Ejemplo 1. Efecto de la delección genética de un único alelo de Dll4 sobre la
15 formación de brotes de vasos sanguíneos en la vasculatura retiniana en desarrollo.**

[0048] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de la deficiencia genética parcial de Dll4 sobre la formación de brotes de vasos sanguíneos durante la angiogénesis retiniana en el desarrollo normal.

20 [0049] Animales. Se usó la tecnología Velocigene™ (Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:652-9; patente de EE.UU. 6.586.251) para sustituir la región codificante completa de Dll4 con el gen indicador de β -galactosidasa en células pluripotenciales embrionarias de ratones híbridos C57BL/6:129. Los machos quiméricos se cruzaron con hembras ICR. Se usaron ratones Dll4^{+/lacZ} retrocruzados durante 3 generaciones
25 con ICR (87,5% de ICR) para este estudio.

[0050] Histoquímica e Inmunotinción. Las crías de ratón se sacrificaron humanamente en P7. Los ojos se enuclearon, y se disecaron las retinas, se fijaron durante la noche con un 4% de paraformaldehído, se tiñeron con lectina I de Griffonia simplicifolia (GS) marcada con FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA), y se
30 realizó la preparación microscópica. Las imágenes se captaron mediante el uso de un microscopio Nikon (Melville, NY).

[0051] Cuantificaciones. Las medidas se llevaron a cabo mediante el uso del programa informático Scion Image. Cada condición experimental se ensayó al menos por triplicado. Se usó la prueba t de Student y el análisis bidireccional de la varianza
35 para determinar la significación estadística.

4958

[0052] Resultados. El plexo periférico fue mucho más denso en los ratones Dll4^{+lacZ} que en los ratones de tipo natural de la misma camada. Las observaciones a gran aumento pusieron de relieve que el plexo periférico más denso en las retinas de los ratones Dll4^{+lacZ} consistió en capilares que tuvieron un diámetro mayor, más interconectados e hiperfusionados, de forma que en algunas áreas los vasos se unían para formar un sincitio, y, además, hubo muchos más brotes en el frente de crecimiento (Fig. 1); también se observaron filópodos en porciones más interiores del plexo con una frecuencia superior a la normal. Los análisis cuantitativos revelaron que, en comparación con los controles de tipo natural, las retinas de los ratones Dll4^{+lacZ} mostraron un incremento del 68% en el número de brotes en el frente de crecimiento de la vasculatura retiniana superficial (Fig. 1), así como un incremento de más del doble en el número de interconexiones entre capilares por unidad de área, lo que dio como resultado un incremento significativo de la cobertura vascular. A pesar de los cambios morfológicos notables, la inyección intravascular de lectina marcada con fluoresceína llenó completamente el plexo vascular superficial en desarrollo, excepto por los filópodos que se extendían desde las células de las puntas, en los ratones Dll4^{+lacZ} así como en los de tipo natural, lo que indica que todos los componentes de la vasculatura en desarrollo tuvieron luces y fueron funcionales.

20 **Ejemplo 2. Efecto de la inhibición de Dll4/Notch con Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 sobre la vasculatura retiniana en desarrollo.**

[0053] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de la inhibición farmacológica de la señalización Dll4/Notch sobre la proliferación de células endoteliales y la formación de brotes de vasos sanguíneos durante la angiogénesis retiniana del desarrollo normal.

[0054] Anticuerpos y reactivos. Dll4-Fc comprende el dominio extracelular de Dll4 de ratón o humano y la parte Fc de la IgG humana. Dll4-Fc se expresó en células CHO y se purificó por afinidad mediante cromatografía con proteína-A. Se produjo el anticuerpo anti-Dll4 mediante la inmunización de conejos con mDll4-hFc recombinante. El suero se purificó parcialmente mediante cromatografía con proteína-A antes del uso.

[0055] Animales. Se usaron ratones C57/Bl6 (Taconic) para estudiar el efecto de Dll4-Fc o del anticuerpo hacia Dll4 neutralizante sobre la vasculatura retiniana en desarrollo.

35 [0056] Microinyecciones Intravítreas. Las microinyecciones intravítreas (30-100 nl) de los compuestos de investigación se hicieron entre el ecuador y el limbo corneal

57
50

mediante el uso de un nanoinyector de Drummond Scientific (BroPA) equipado con una aguja de vidrio.

[0057] Marcaje con BrdU. Las células en proliferación se marcaron mediante la administración de BrdU (1 mg/kg i.p.) 20 h después de la inyección intravítrea de hFc o Dll4-Fc. Las retinas se recogieron 4 h más tarde y se tiñeron con anticuerpos anti-BrdU (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) y VE-Cadherina (BD PharMingen, San Diego, CA).

[0058] Resultados. Para estudiar el efecto de la deficiencia intrarretiniana local en la señalización Dll4/Notch, y que no es secundaria respecto de una anomalía sistémica sin detectar, se inyectó una versión soluble de Dll4 (denominada Dll4-Fc) que se une a los receptores Notch sin activarlos, por lo que se bloquea la acción del Dll4 endógeno, o un anticuerpo policlonal neutralizante específico para el dominio extracelular de Dll4, en el vítreo de ratones de tipo natural. Tres días después de la administración intraocular de cada bloqueante de Dll4, los vasos retinianos exhibieron cambios morfológicos que se parecían mucho a las anomalías vasculares halladas en los ratones Dll4^{+/-lacZ}, lo que incluye una densidad de vasos sanguíneos y un calibre de los vasos drásticamente incrementados. Además, estos cambios morfológicos característicos ocurrieron rápidamente, y fueron claramente evidentes en 24 horas.

[0059] El marcaje con BrdU también demostró un incremento de la proliferación de células endoteliales dentro de las 24 h del bloqueo con Dll4 (Fig. 2). El incremento del ~17% observado en la velocidad de proliferación pudo producir un incremento de más del 50% en el número de células en tres a cuatro tiempos de duplicación.

25 **Ejemplo 3. Efecto de Dll4-Fc y del anticuerpo anti-Dll4 sobre la vascularización, perfusión y anomalías vasculares retinianas en ratones con OIR.**

[0060] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de Dll4-Fc y del anticuerpo anti-Dll4 sobre el crecimiento de los vasos retinianos, la formación de anomalías vasculares y la perfusión retiniana en la retinopatía isquémica inducida por oxígeno (OIR).

[0061] Para determinar si la señalización Dll4/Notch desempeña un papel en la angiogénesis patológica así como durante el desarrollo normal, se utilizó el modelo de OIR. En el modelo de OIR, la exposición de las crías de ratón a hiperoxia en P7 da como resultado una obliteración rápida de capilares en la retina central. Tras la vuelta al aire ambiental en P12, la zona avascular se hace intensamente hipóxica, lo que a su vez provoca una neovascularización anormal considerable, caracterizada por el

58
St

crecimiento ectópico de vasos hacia el vítreo ('penachos' vasculares epirretinianos) y la formación de comunicaciones arteriovenosas anormales; las partes centrales de la retina permanecen avasculares en gran medida durante un periodo prolongado.

[0062] Animales y modelo de OIR. Se usaron ratones C57/Bl6 (Taconic) para estudiar el efecto de Dll4-Fc o del anticuerpo hacia Dll4 neutralizante sobre la neovascularización retiniana en OIR. Se produjo la OIR siguiendo el método desarrollado por Smith et al. (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994, 35:101-111). Brevemente, las crías de ratón y sus madres se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno desde los días postnatales (P) 7 hasta P12, y después se devolvieron al aire ambiental. La exposición a hiperoxia induce una vaso-obliteración rápida en la retina central. Cuando los ratones se devuelven al aire ambiental (P12), la pérdida de vasos de la retina central da como resultado una hipoxia / isquemia intensa que a su vez estimula los cambios vasculares patológicos descritos anteriormente.

[0063] Para marcar los vasos sanguíneos persistentes, se inyectaron 50 µl de lectina de *Lycopersicon esculentum* (LE) marcada con rojo Texas (1 mg/ml; Vector Laboratories, CA) en el ventrículo cardiaco izquierdo y se dejó circular durante 5 min.

[0064] Resultados. La inhibición de Dll4/Notch con Dll4-Fc o con anticuerpo anti-Dll4 mejoró la neovascularización patológica (Fig. 3A-B), estimuló el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos (Fig. 4A-B) y mejoró la reperusión retiniana (Fig. 5).

[0065] Se inyectó de forma intravítrea Dll4-Fc o anticuerpo anti-Dll4 o una proteína de control (hFc) en P13, un día después de devolver los animales al aire ambiental, mucho después de que se completase la vaso-obliteración. Cuando se estudiaron las retinas en P17, la administración de Dll4-Fc o de anticuerpo anti-Dll4 inhibió drásticamente el crecimiento ectópico de penachos neovasculares patológicos hacia el vítreo (Fig. 1), y también evitó la formación de comunicaciones arteriovenosas anormales. Las áreas ocupadas por los penachos neovasculares se redujo un 43% en las retinas tratadas con Dll4-Fc y un 85% en las retinas tratadas con anticuerpo anti-Dll4, ambas en comparación con las retinas de control tratadas con hFc.

[0066] Además, se descubrió que Dll4-Fc y el anticuerpo anti-Dll4 estimulan una formación más extensa de brotes de vasos nuevos a partir de los capilares y las venas que bordean la zona avascular, lo que da como resultado un recrecimiento más rápido de los vasos sanguíneos hacia la retina central, en donde la vasculatura había disminuido, reduciendo así el área retiniana avascular (Fig. 4A-B). Las áreas avasculares se redujeron un 43% en las retinas tratadas con Dll4-Fc y un 63% en las retinas tratadas con anticuerpo anti-Dll4. Fue especialmente notable el recrecimiento capilar extenso que procedía de las venas de la zona avascular de las retinas tratadas

82
59

con Dll4-Fc. Así, la atenuación de la señalización de Dll4/Notch favoreció la extensión de brotes vasculares nuevos en la superficie retiniana, y atenuó la formación de neovascularización epirretiniana, lo que dio como resultado una reformación más rápida del plexo vascular superficial. Los vasos recién formados fueron funcionales y exhibieron una reperfusión retiniana mejorada, evidente por la reducción de un 45% de las áreas sin perfundir en las retinas tratadas con Dll4-Fc (Fig. 5).

Ejemplo 4. Efecto de Dll4-Fc y del anticuerpo anti-Dll4 sobre la hipoxia/isquemia retiniana en el modelo de OIR.

[0067] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de Dll4-Fc y del anticuerpo anti-Dll4 sobre la hipoxia/isquemia retiniana en el modelo de OIR de neovascularización patológica.

[0068] El crecimiento excesivo de vasos sanguíneos en ciertas circunstancias puede interferir con la circulación sanguínea normal y reducir la oxigenación tisular. Para analizar si la inhibición de Dll4/Notch puede mejorar la oxigenación tisular, se usó HYPOXYPROBE™-1 (Chemicon) en un ensayo no invasivo para detectar la hipoxia tisular y determinar el efecto del tratamiento con Dll4-Fc sobre la hipoxia/isquemia retiniana. Se inyectaron 100 mg/kg de HYPOXYPROBE™-1 de forma intraperitoneal una hora antes de recoger las retinas para su estudio.

[0069] Resultados. El crecimiento de vasos funcionales nuevos tras la administración intravítrea de inhibidores de Dll4/Notch redujo de manera eficaz la hipoxia/isquemia tisular, como se evidencia por la reducción de un 69% y un 30% de las áreas positivas para hypoxyprobe en las retinas tratadas con Dll4-Fc o con anticuerpo anti-Dll4, respectivamente (Fig. 6A-B).

Ejemplo 5. La delección genética de un único alelo de Dll4 reduce la vaso-obliteración inducida por hiperoxia.

[0070] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de la deficiencia genética parcial de Dll4 sobre la regresión de los vasos sanguíneos inducidos por hiperoxia.

[0071] Animales. Se generaron ratones $Dll4^{+/lacZ}$ retrocruzados durante 3 generaciones con ICR (87,5% de ICR) como se describió anteriormente. Debido a una mutación recesiva (rd/rd), la capa de células fotorreceptoras retinianas comienza a degenerar en P12 en los ratones ICR. Por lo tanto, para evitar los efectos secundarios potenciales de la pérdida de fotorreceptores en la vasculatura retiniana, para estudiar etapas posteriores del desarrollo de la retina y para todos los experimentos de OIR, se

S3
60

retrocruzaron los ratones $Dll4^{+/lacZ}$ (87,5% de ICR) con C57BL/6 para producir ratones Rd/rd, que no exhiben la degeneración de los fotorreceptores.

[0072] Las crías de ratón se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno a partir de los días posnatales (P) 7 a P12. Se recogieron las retinas, y se analizó la vasculatura retiniana en preparaciones microscópicas.

[0073] Resultados. La expresión reducida de $Dll4$ en la vasculatura retiniana de los ratones $Dll4^{+/lacZ}$ evita parcialmente la pérdida de vasos sanguíneos retinianos inducida por hiperoxia (Fig. 7). En el modelo de OIR, la exposición de las crías de ratón a hiperoxia en P7 da como resultado la oclusión y obliteración rápidas de capilares en la retina central. Para determinar si la inhibición de $Dll4$ /Notch puede tener un efecto protector sobre los vasos sanguíneos, también se analizó el efecto de la deficiencia genética parcial de $Dll4$ en los ratones $Dll4^{+/lacZ}$ sobre la vaso-obliteración inducida por hiperoxia. Al estudiar los animales en P12 (para determinar el grado de vaso-obliteración hiperóxica) se descubrió que la vaso-obliteración se redujo un 40% en los ratones $Dll4^{+/lacZ}$ en comparación con los animales de control de tipo natural de la misma camada, lo que sugiere que los inhibidores de $Dll4$ pueden proteger a los vasos sanguíneos existentes de la regresión.

Ejemplo 6. Efecto de $Dll4$ -Fc y del anticuerpo anti- $Dll4$ sobre la vaso-obliteración inducida por hiperoxia.

[0074] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de la inhibición de $Dll4$ /Notch con $Dll4$ -Fc y con anticuerpo anti- $Dll4$ sobre la regresión de los vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

[0075] Animales. Se usaron ratones C57/Bl6 (Taconic) para estudiar el efecto de $Dll4$ -Fc o del anticuerpo hacia $Dll4$ neutralizante sobre la vaso-obliteración retiniana inducida por oxígeno. Se llevaron a cabo microinyecciones intravítreas de los compuestos de investigación en el día posnatal 8. En el día posnatal 9 se colocaron las crías en un medio con un 75% de oxígeno. Las retinas se recogieron 24 horas más tarde y la vasculatura retiniana se analizó en preparaciones microscópicas.

[0076] Resultados. La inyección intravítrea de $Dll4$ -Fc o de anticuerpo anti- $Dll4$ redujo drásticamente las áreas de vasculatura obliterada en un 97% y un 41%, respectivamente (Fig. 8A-B).

Ejemplo 7. Efecto de $Dll4$ -Fc y del anticuerpo anti- $Dll4$ sobre la oclusión de los vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

54
61

[0077] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto de la inhibición de Dll4/Notch con Dll4-Fc y con anticuerpo anti-Dll4 sobre la oclusión de los vasos sanguíneos inducida por hiperoxia. Todos los procedimientos se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

- 5 [0078] El tratamiento con Dll4-Fc y con anticuerpo anti-Dll4 redujo las tareas retinianas sin perfundir en un 40% y un 29%, respectivamente (Fig. 9A-B).

Ejemplo 8. Efecto de la administración sistémica de Dll4-Fc sobre la regresión de los vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

- 10 [0079] Se llevó a cabo una investigación para determinar el efecto del tratamiento sistémico con Dll4-Fc sobre la regresión de los vasos sanguíneos inducida por hiperoxia.

- [0080] Se inyectaron 4,1 mcg de hDll4-hFc o 5 mcg de proteína de control hFc humana de forma intravítrea (ITV), o se inyectó hDll4-hFc de forma intraperitoneal a
15 una dosis de 25 mg por kg de peso corporal en P7. Las crías se colocaron en un medio con un 75% de oxígeno en P8, y se analizó la vasculatura retiniana en P9. Todos los demás procedimientos se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

- [0081] Resultados. Tanto la administración local (intravítrea) como la sistémica (intraperitoneal) de Dll4-Fc redujo las áreas de vasculatura obliterada en un 86% y un
20 56%, respectivamente, lo que indica que independientemente de la vía de administración los inhibidores de Dll4 se pueden usar de manera eficaz para proteger a los vasos sanguíneos de la regresión (Fig. 10).

8862

REIVINDICACIONES:

1. El uso de un agente capaz de inhibir la actividad de Dll4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la inhibición o la mejora de un trastorno isquémico o vascular, en el que el antagonista de Dll4 comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de bloquear la unión de Dll4 a un receptor Notch, o comprende un fragmento de Dll4, conectado opcionalmente a un componente de multimerización.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo hacia Dll4 o el fragmento de anticuerpo es policlonal o monoclonal.
3. El uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es humanizado, quimérico, o es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo completamente humano.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno isquémico o vascular es una enfermedad o afección ocular que se caracteriza por la presencia de vasos sanguíneos anormales y/o por la pérdida de vasos sanguíneos normales o de la función de los vasos.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la enfermedad ocular es retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión venosa o arterial retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular asociada a la edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante de córnea.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto tratado es un ser humano.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno isquémico o vascular es una lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardíaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y a otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización de heridas, trasplante de órganos o tejidos, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, arteriosclerosis, e hipertensión sistémica o pulmonar.

56
63**RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN**

Un método terapéutico para el tratamiento de trastornos isquémicos o vasculares mediante la administración de un agente capaz de inhibir la actividad del ligando 4 similar a delta (Dll4) humano en un sujeto que lo necesita. Preferiblemente,

5 el agente es un anticuerpo anti-Dll4 o fragmento de anticuerpo capaz de inhibir la unión de Dll4 a un receptor Notch. En una realización, el trastorno isquémico o vascular es una lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardíaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y a otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización de heridas, trasplante de órganos o

10 tejidos, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, aterosclerosis, e hipertensión sistémica o pulmonar. En otra realización, la enfermedad tratada es una enfermedad o afección ocular tal como retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión venosa o arterial retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular relacionada con la edad,

15 neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante de córnea.

GA

1/10

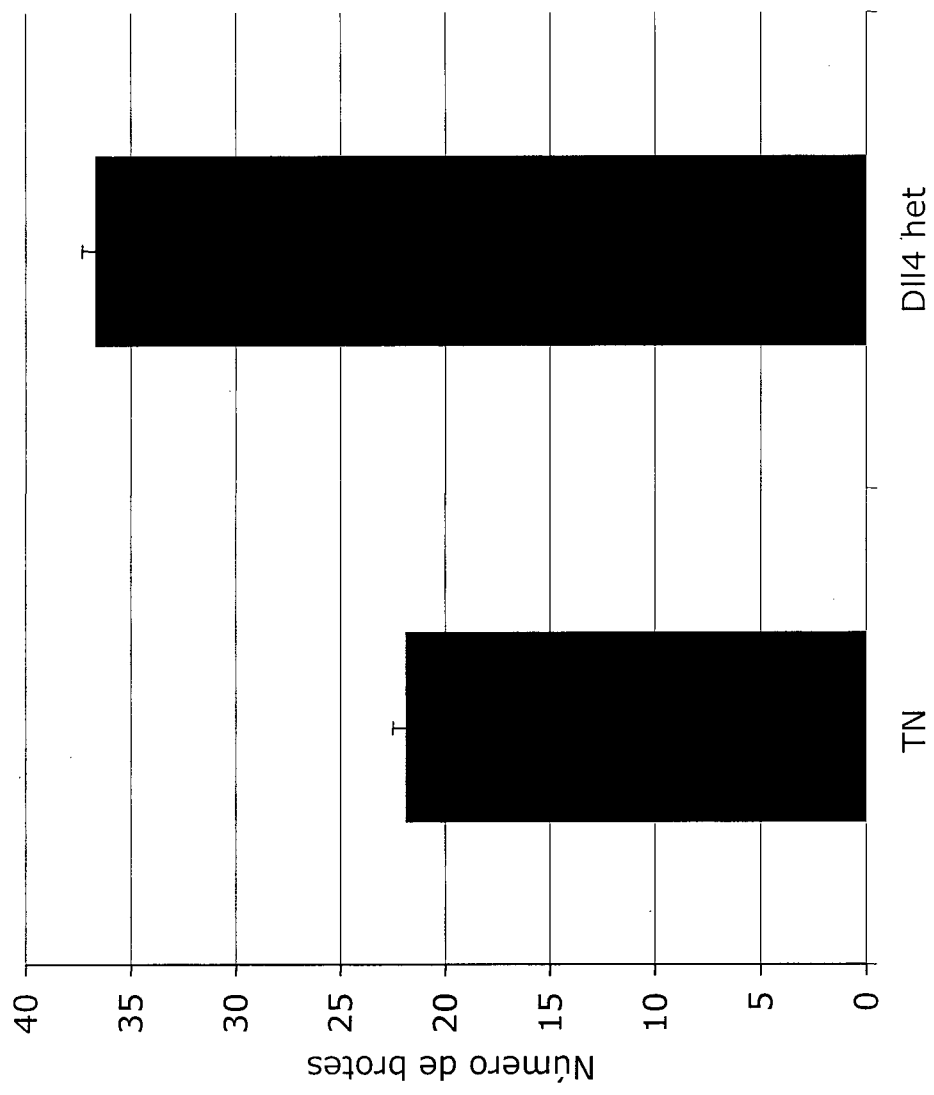


Fig. 1

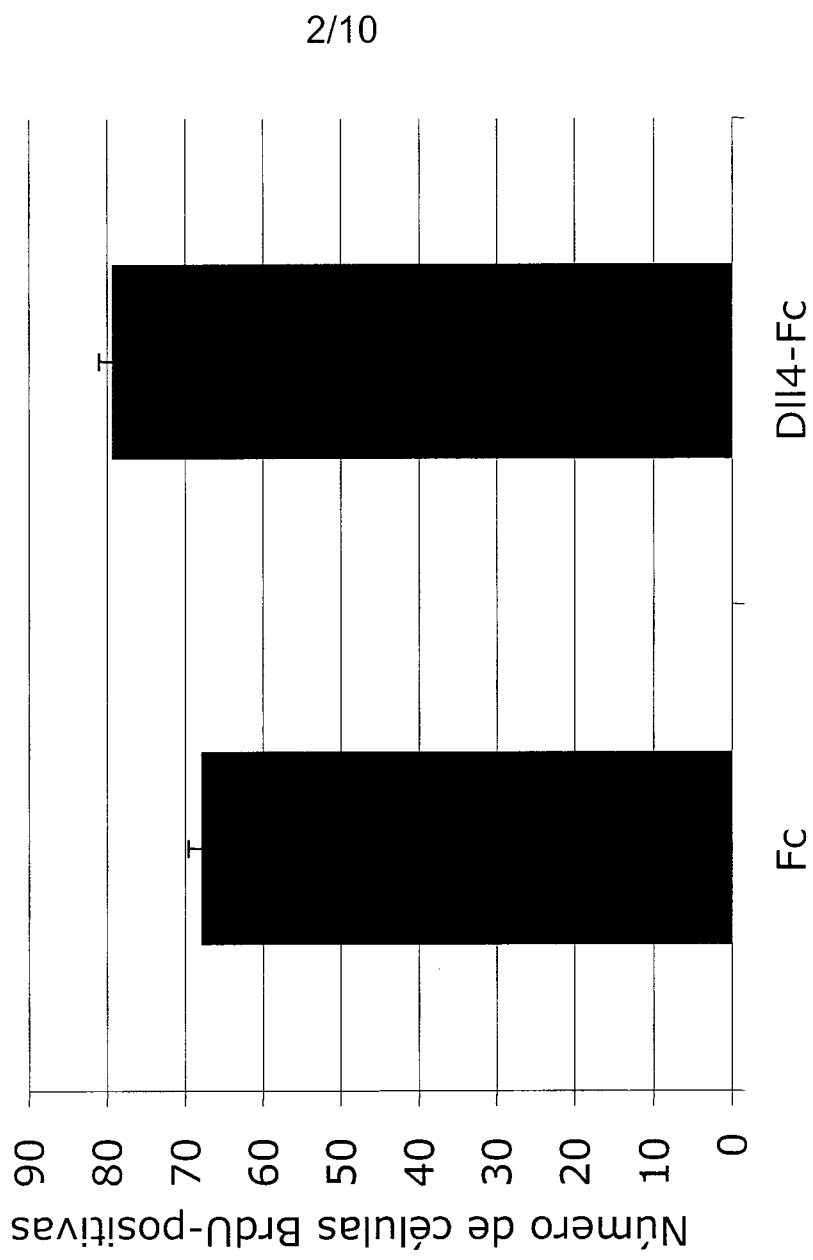


Fig. 2

58
65

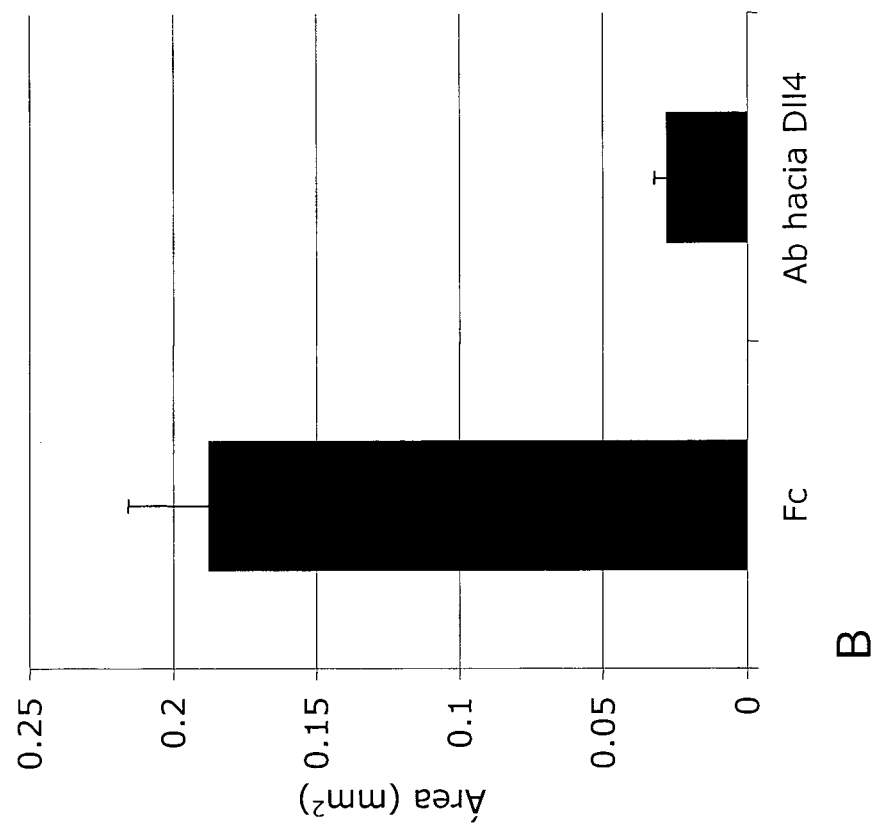
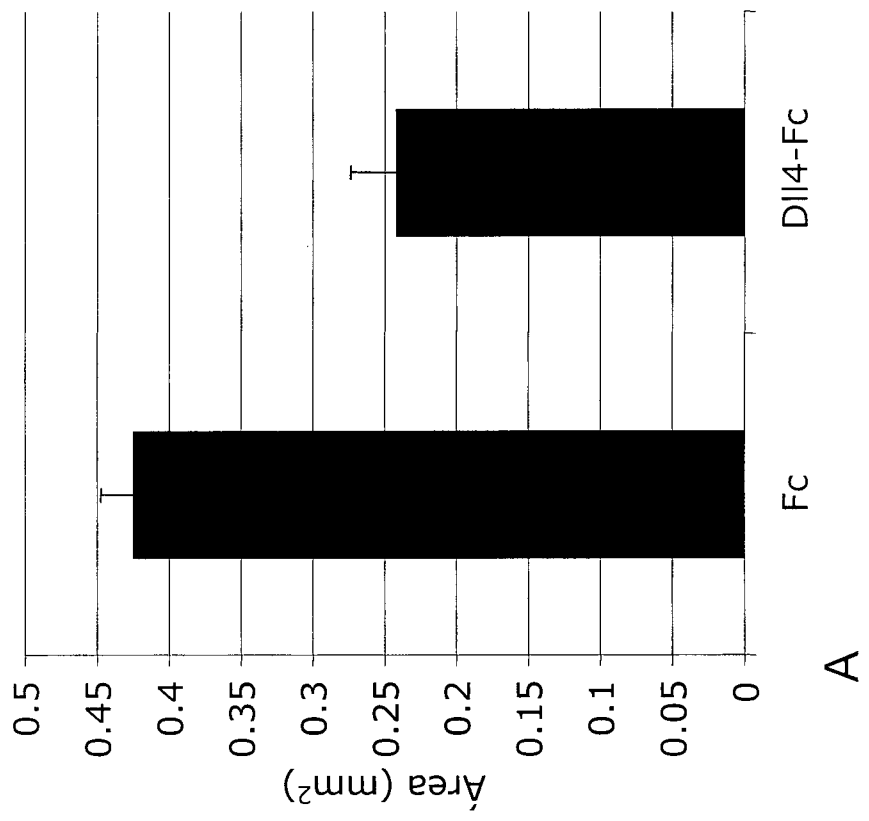


Fig. 3

59
66

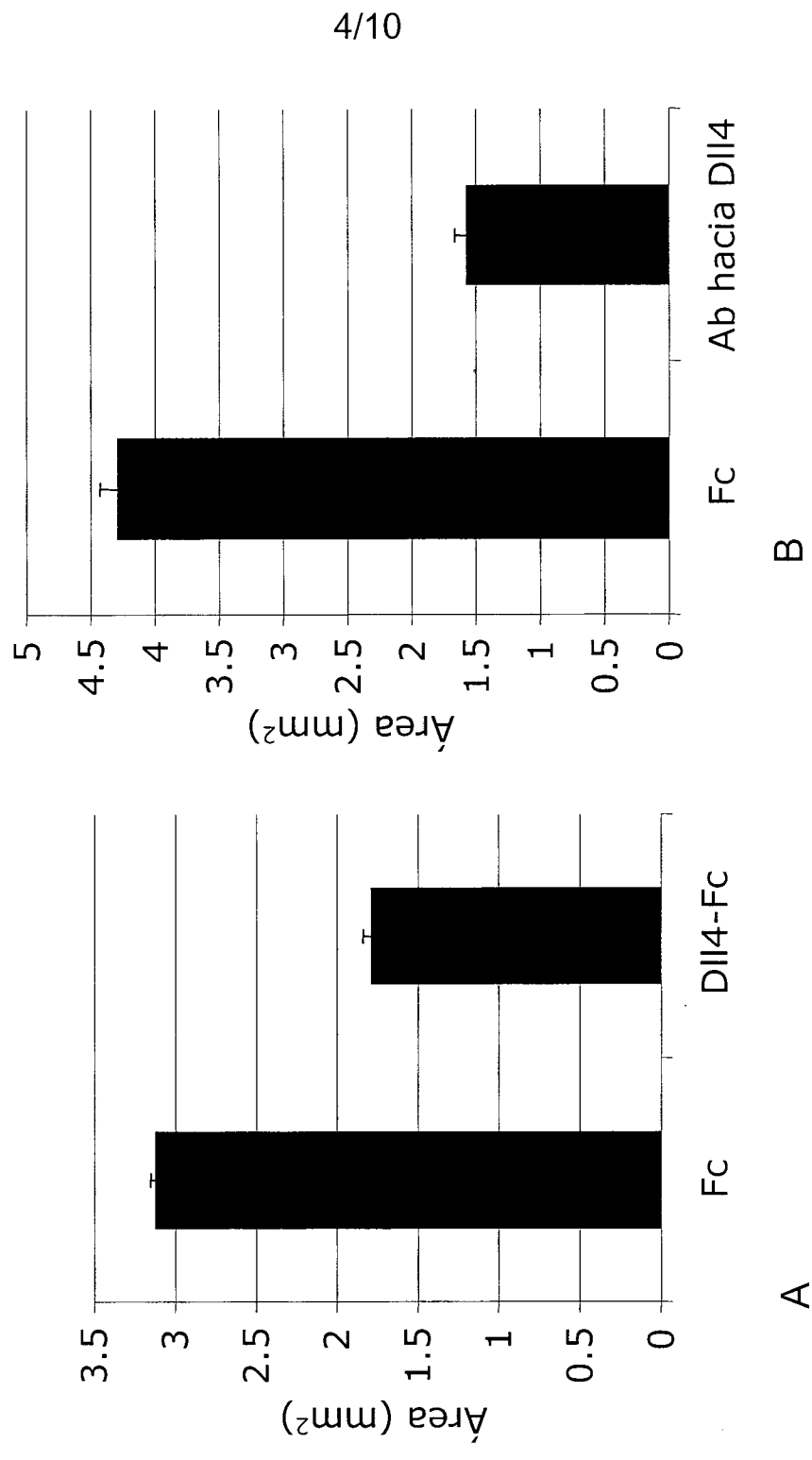


Fig. 4

66

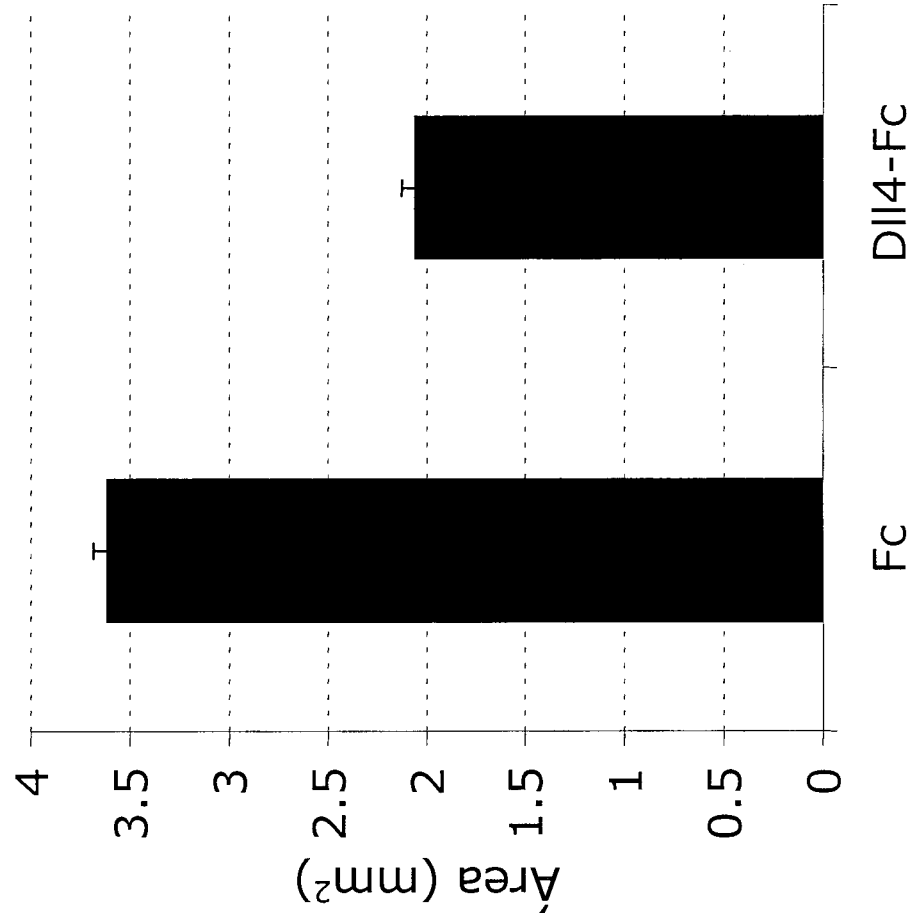
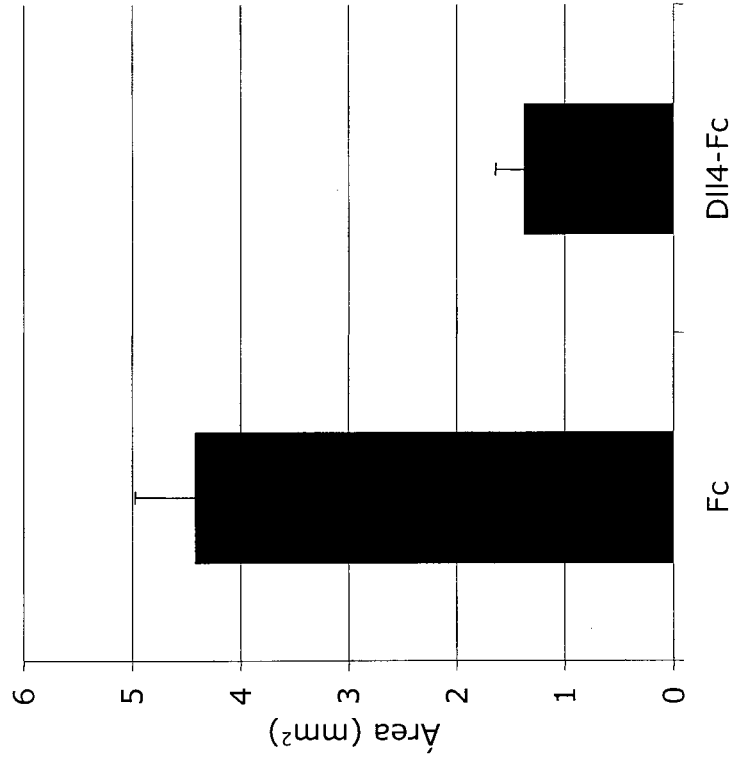
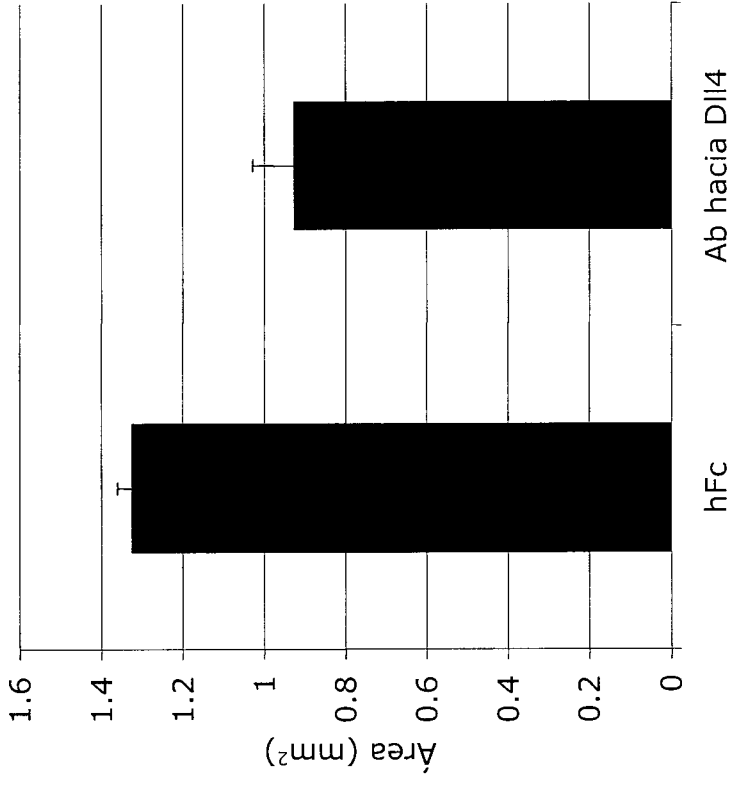


Fig. 5

6/6



A



B

6/10

Fig. 6

62
68

63
69

7/10

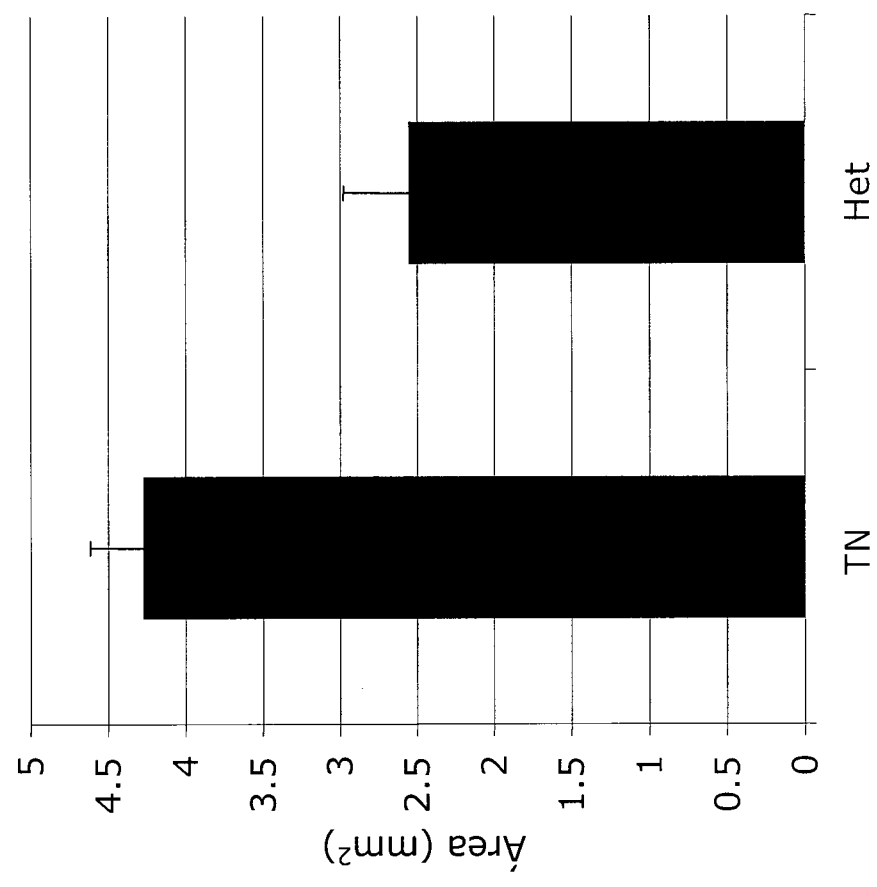


Fig. 7

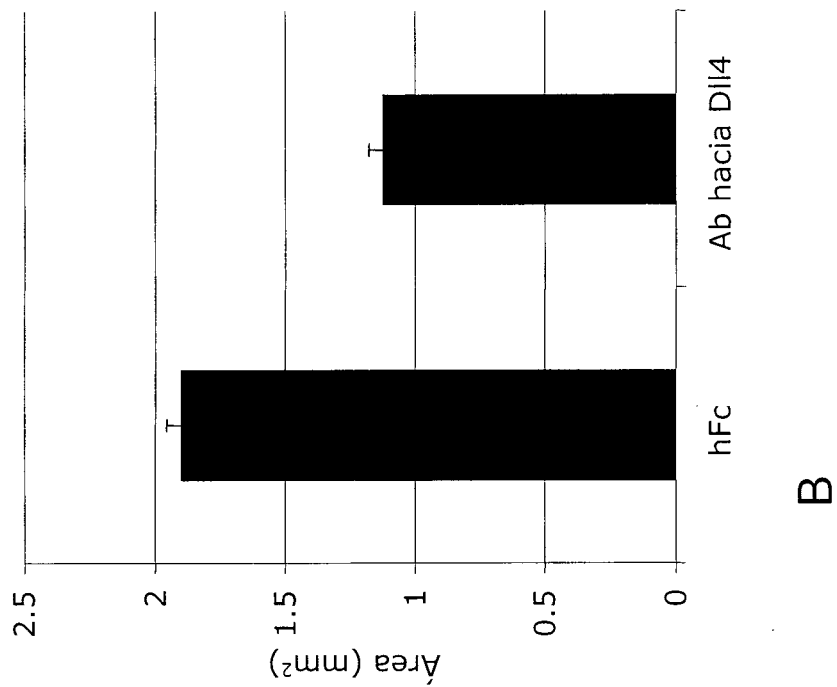
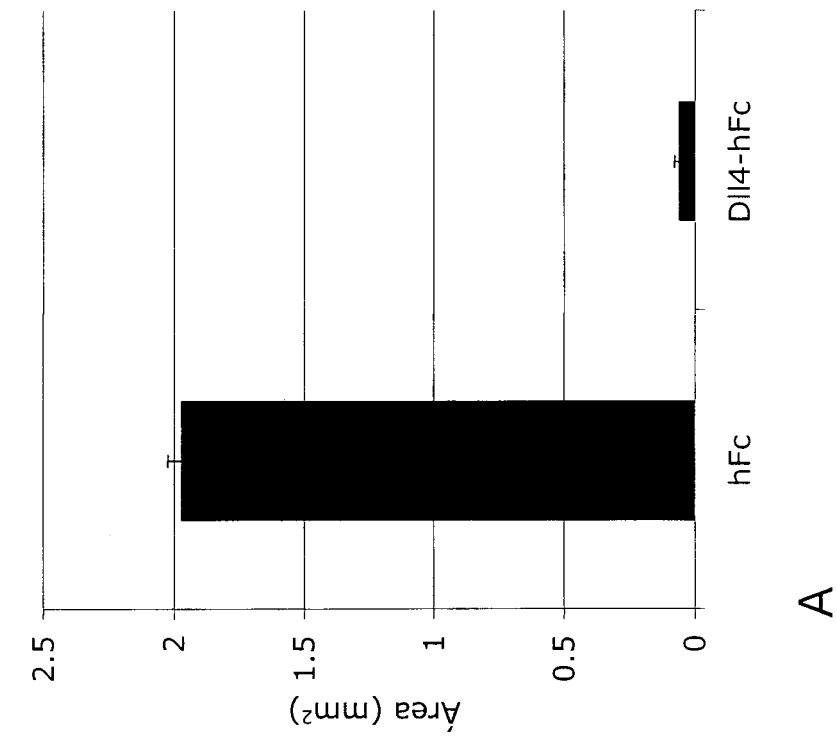


Fig. 8.

20

65
71

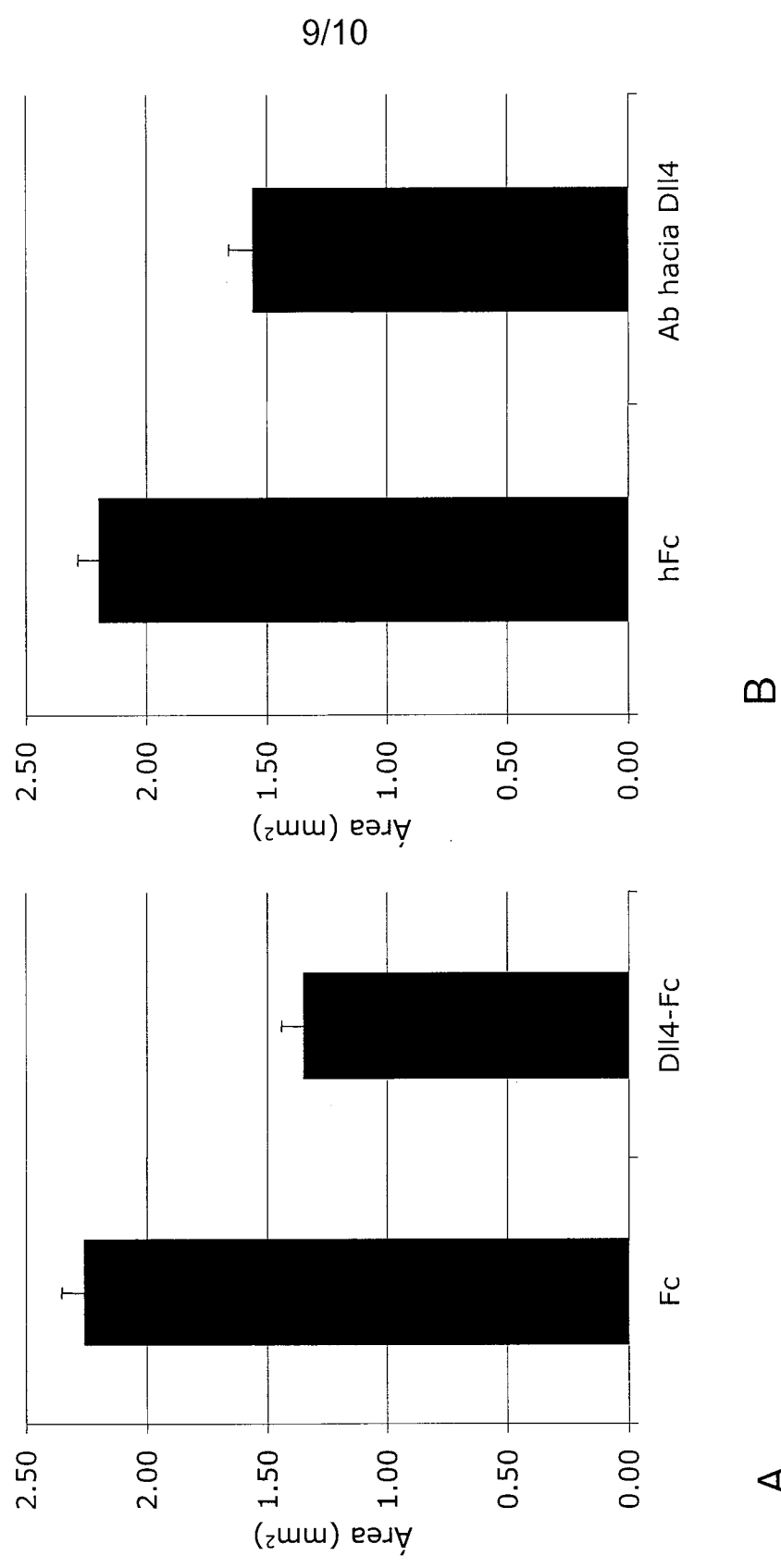


Fig. 9

86
72

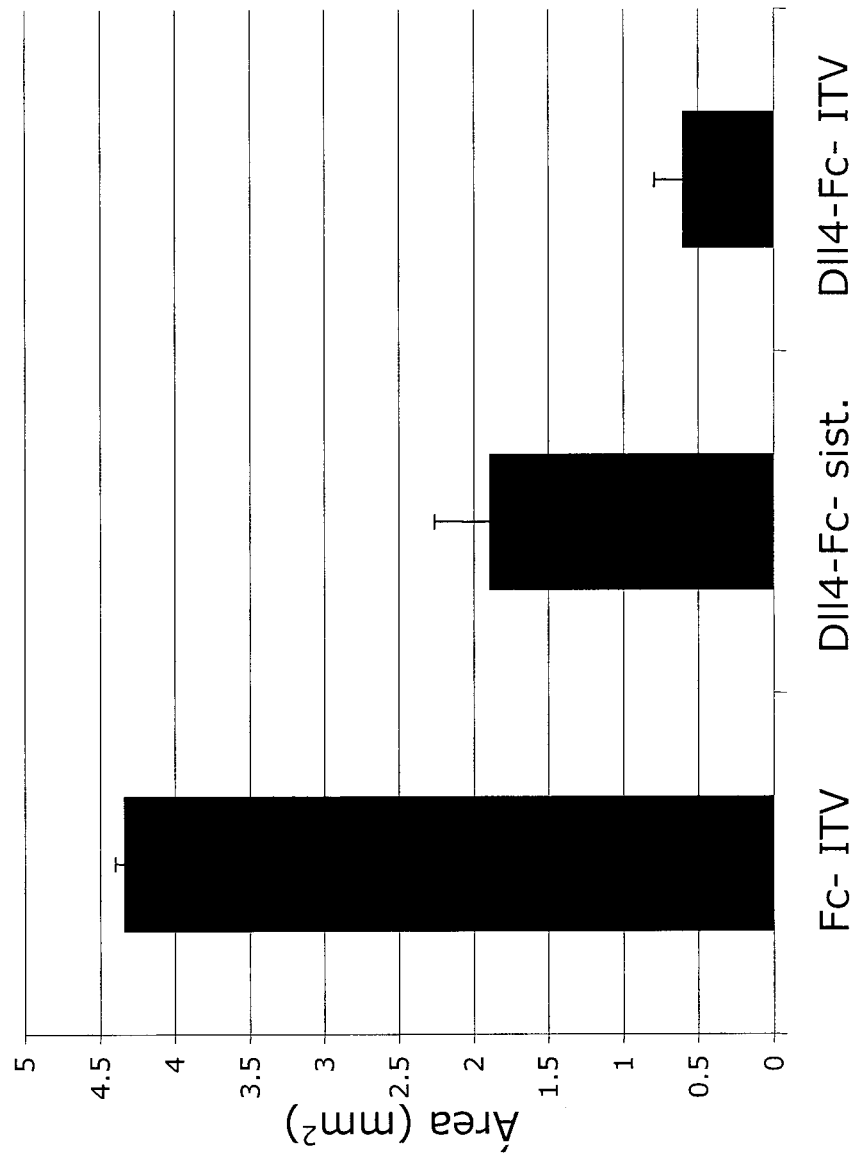


Fig. 10.

57
73

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Métodos terapéuticos para el tratamiento de trastornos oculares vasculares con antagonistas de DLL4
- <130> 3090A-WO
- <140> pendiente de asignar
- <141> 07-08-2007
- <150> 60/836.003
- <151> 07-08-2006
- <160> 5
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 2058
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

68
74

atggcggcag	cgccccggag	cgcctctggc	tgggcgctac	tgtctgtggt	ggcacttttg	60
cagcagcgcg	cgcccggtc	cggcgtcttc	cagctgcagc	tgcaggagt	catcaacgag	120
cgcggcgtag	tggccagtgg	gcggccttgc	gagcccggt	gccggacttt	cttcgcgctc	180
tgccttaagc	acttcagggc	ggtcgtctcg	cccggaacct	gcaccttcgg	gaccgtctcc	240
acgcgggtat	tgggcaccaa	ctccttcgct	gtccgggacg	acagtagcgg	cgggggggcg	300
aacctctctc	aactgcctt	caatttcacc	tggccgggta	ccttctcgct	catcatcgaa	360
gcttggcagc	cgccaggaga	cgacctgcgg	ccagaggcct	tgccaccaga	tgcactcatc	420
agcaagatcg	ccatccaggg	ctccctagct	gtgggtcaga	actggttatt	ggatgagcaa	480
accagcacc	tcacaaggct	gcgctactct	taccgggtca	tctgcagtga	caactactat	540
ggagacaaact	gctcccgcct	gtgcaagaag	cgcaatgacc	acttcggcca	ctatgtgtgc	600
cagccagatg	gcaacttgtc	ctgcctgccc	ggttggactg	gggaatattg	ccaacagcct	660
atctgtcttt	cgggctgtca	tgaacagaat	ggctactgca	gcaagccagc	agagtgcctc	720
tgccgccag	gctggcaggg	ccggctgtgt	aacgaatgca	tccccacaa	tggctgtcgc	780
cacggcacct	gcagcactcc	ctggcaatgt	acttgtgatg	agggctgggg	aggcctgttt	840
tgtgaccaag	atctcaacta	ctgcacccac	cactcccat	gcaagaatgg	ggcaacgtgc	900
tccaacagtg	ggcagcgaag	ctacacctgc	acctgtcgcc	caggctacac	tgggtgtggac	960
tgtgagctgg	agctcagcga	gtgtgacagc	aacctctgtc	gcaatggagg	cagctgtaat	1020
gaccaggagg	atggctacca	ctgcctgtgt	cctccgggct	actatggcct	gcattgtgaa	1080
cacagcacct	tgagctgcgc	cgactcccc	tgttcaatg	ggggtcctct	ccgggagcgc	1140
aaccaggggg	ccaactatgc	ttgtgaatgt	cccccaact	tcaccggctc	caactgcgag	1200
aagaaagtgg	acaggtgcac	cagcaacccc	tgtgccaacg	ggggacagtg	cctgaaccga	1260
ggtccaagcc	gcatgtgccg	ctgcctgctc	ggattcaagg	gcacctactg	tgaactccac	1320
gtcagcgact	gtgcccgtaa	cccttgccgc	cacggtggca	cttgccatga	cctggagaat	1380
gggctcatgt	gcacctgccc	tgccgcttc	tctggccgac	gctgtgaggt	gcggacatcc	1440
atcgatgect	gtgcctcgag	tcctgcttc	aacaggggca	cctgctacac	cgacctctcc	1500
acagacacct	ttgtgtgcaa	ctgcccttat	ggctttgtgg	gcagccgctg	cgagttcccc	1560
gtgggcttgc	cgcccagctt	ccctgggtg	gccgtctcgc	tgggtgtggg	gctggcagtg	1620
ctgctggtag	tgtgggcat	ggtggcagtg	gctgtgcggc	agctgcggct	tcgacggccg	1680
gacgacggca	gcagggaagc	catgaacaac	ttgtcggact	tccagaagga	caacctgatt	1740
cctgccgccc	agcttaaaaa	cacaaaccag	aagaaggagc	tggaaagtga	ctgtggcctg	1800
gacaagtcca	actgtggcaa	acagcaaaac	cacacattgg	actataatct	ggccccaggg	1860
cccctggggc	gggggaccat	gccaggaaaag	tttccccaca	gtgacaagag	cttaggagag	1920
aaggcgccac	tgcggttaca	cagtgaaaaag	ccagagtgtc	gatatcagc	gatatgctcc	1980
cccagggaact	ccatgtacca	gtctgtgtgt	ttgatatcag	aggagaggaa	tgaatgtgtc	2040
attgccacgg	aggtataa					2058

<210> 2
<211> 685
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

69
75

Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
1				5					10				15		
Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu
			20					25					30		
Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg
		35					40					45			
Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His
	50					55					60				
Phe	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Ser
65					70					75					80
Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser
				85					90					95	
Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro
			100					105					110		
Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp
		115					120					125			
Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala
	130					135					140				
Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln
145					150					155					160
Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser
				165					170					175	
Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn
			180					185					190		
Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys
		195					200					205			
Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser
	210					215					220				
Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu
225					230					235					240
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His
				245					250					255	
Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys
			260					265					270		
Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys
		275					280					285			
Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly
	290					295					300				
Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp
305					310					315					320
Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly
				325					330					335	
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro
			340					345					350		
Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp
		355					360					365			
Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala
	370					375					380				
Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu
385					390					395					400
Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln
				405					410					415	
Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
			420					425					430		

70
76

Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro
		435						440					445		
Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys
	450					455					460				
Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser
465					470					475					480
Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr
				485					490						495
Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe
		500						505					510		
Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro
		515					520					525			
Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu
	530					535					540				
Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro
545					550					555					560
Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys
				565					570					575	
Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys
		580						585					590		
Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln
		595					600					605			
Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg
	610					615					620				
Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu
625					630					635					640
Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser
				645					650					655	
Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile
		660					665					670			
Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val			
		675					680					685			

<210> 3
<211> 3427
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3

```

ctcgcaggct aggaaccoga ggccaagagc tgcagccaaa gtcacttggg tgcagtgtac 60
tccctcacta gcccgctcga gaccctagga tttgctccag gacacgtact tagagcagcc 120
accgccagct gccctcacc tggattacct accgagggcat cgagcagcgg agtttttgag 180
aagggcagaa gggagcagcg tcccgagggg aatcagcttt tcaggaactc ggctggcaga 240
cgggacttgc gggagagcga catccctaac aagcagatto ggagtcccgg agtggagagg 300
acaccccaag ggatgacgcc tgcgtcccgg agcgctgtgc gctgggcgct actgctgctg 360
gcggtactgt ggccgcagca gcgcgctgcg ggtcccgca tcttcagct gcgctgcag 420
gagttcgtca accagcgcg tatgctggcc aatgggcagt cctgcgaacc gggtgcgg 480
actttcttcc gcatttgct taagcacttc caggcaacct tctccgagg accctgcacc 540
tttggaatg tctccacgcc ggtattgggc accaactcct tgcgtcgtcag ggacaagaat 600
agcggcagtg gtcgcaaccc tctgcagttg ccttcaatt tcacctggcc gggaaccttc 660
tcaactcaaca tccaagcttg gcacacaccg ggagacgacc tgcggccaga gacttcgaca 720
ggaaactctc tcatcagcca aatcatcatc caaggctctc ttgctgtgg taagatttgg 780
cgaacagacg agcaaatga caccctcacc agactgagct actcttaccg ggtcatctgc 840
agtgaact actatggaga gagctgttct cgctatgca agaagcgca tgaccacttc 900
ggacattatg agtgcagcc agatggcagc ctgtcctgcc tgcgggctg gactgggaag 960
tactgtgacc agcctatag tctttctggc tgcctgagc agaatggta ctgagcaag 1020
ccagatgagt gcctctgcg tccaggttgg cagggtcgcc tgtgcaatga atgtatcccc 1080
cacaatggct gtgctcatgg cactgcagc atccctggc agtgtgctg cgtgagggga 1140
tggggaggto tgttttgtga ccaagatctc aactactgta ctaccactc tccgtgcaag 1200
aatggatcaa cgtgttccaa cagtgggcca aagggttata cctgcacctg tctccaggc 1260

tactgtgtg agcactgtga gctgggactc agcaagtgtg ccagcaaccc ctgtcgaaat 1320
ggtggcagct gtaaggacca ggagaatagc taccactgcc tgtgtcccc aggetactat 1380
ggccagcact gtgagcatag taccttgacc tgtgcggact caccctgctt caatgggggc 1440
tcttgccggg agcgcaacca ggggtccagt tatgcctgg aatgcccccc caactttacc 1500
ggctctaact gtgagaagaa agtagacagg tgtaccagca acccgtgtgc caatggaggg 1560
cagtgcctga acagaggctc aagcogaacc tgcgctgcc ggcctggatt cacaggcacc 1620
cactgtgaac tgcacatcag cgattgtgcc cgaagtccct gtgcccacgg gggaacttgc 1680
cacgatctgg agaatgggcc tgtgtgcacc tgcgccgctg gcttctctgg caggcgtgc 1740
gaggtgcgga taaccacga tgcctgtgcc tccggacct gcttcaatgg ggccacctgc 1800
tactgtggc tctcccaaaa caacttcgtc tgcaactgtc cttatggctt tgtgggcagc 1860
cgctgcgagt ttcccggtgg cttgccacce agcttccccct gggtagctgt ctgctgggc 1920
gtggggctag tggtagctgt ggtgctgctg gtcatggtgg tagtggctgt gcggcagctg 1980
cggttcgga ggcccgatga cgagagcagg gaagccatga acaatctgtc agacttccag 2040
aaggacaacc taatccctgc cgcccagctc aaaaaacaaa accagaagaa ggagctggaa 2100
gtggaactgt gtctggacaa gtccaattgt ggcaactgc agaaccacac attggactac 2160
aatctagccc cgggactcct aggaaggggc agcatgcctg ggaagtatcc tcacagtga 2220
aagagcttag gagagaaggt gccacttcgg ttacacagtg agaagccaga gtgtcgaata 2280
tcagccattt gctctccag ggaactctatg taccaatcag tgtgtttgat atcagaagag 2340
aggaacgagt gtgtgattgc cacagaggtg taaggcagga gctactcag acaccagct 2400
ccgcccagc agctgggct tcttctgca ttgtttacat tgcactcgt atgggacatc 2460
ttagtatgc acagtgtgc tctgggagg agggggaat ggcataact gaacagactg 2520
tgaaccgcc aagagttgca ccgctctgc acacctccag gagtctgctt ggcttcagat 2580
gggcagcccc gccaaaggaa cagagttgag gagttagagg agcatcagtt gagctgat 2640
ctaaggtgcc tctcgaactt ggacttgctc tgccaacagt ggtcatcag gagctcttga 2700
ctgttctcca gagagtggca gtggccctag tgggtcttgg cgtgctgta gctcctgtgg 2760
gcatctgtat ttccaaagt cctttgccc gactccatcc tcacagctgg gcccaaatga 2820
gaaagcagag aggaggttg caaaggatag gctcccga ggcagaacag ccttgagatt 2880
tggcattaag caggagctac tctgcaggtg aggaaagccc gaggagggga cacgtgtgac 2940
tctgcctcc aacccagca ggtgggtgc cactgcagc ctctaggcaa gatttggctc 3000
ttccctggt cctggtgct ctgggctcat gtgaacagat gggcttaggg cacgccccct 3060
ttgccagcca ggggtacagg cctcaactgg gagctcagg ccttcatgct aaactcccaa 3120
taaggagat ggggggaagg gggctgtggc ctaggccctt cctccctca cccccattt 3180
tggcccttg agcctgggt ccaccagtc ccactgttgc ccagagacca acctgaagc 3240
cgattttcaa aaatcaataa tatgaggttt tgtttgtag tttattttgg aatctagtat 3300
tttgataatt taagaatcag aagcactggc ctttctacat tttataacat tattttgtat 3360
ataatgtgta tttataatat gaaacagatg tgtacataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3420
aaaaaa 3427

```

<210> 4
<211> 686
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln
20 25 30
Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly
35 40 45
Gln Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys
50 55 60
His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val
65 70 75 80
Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn
85 90 95
Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp
100 105 110
Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp
115 120 125
Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile

73
79

130					135					140					
Ile	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Ile	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu
145					150					155					160
Gln	Asn	Asp	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys
				165					170						175
Ser	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg
			180					185						190	
Asp	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser
		195					200					205			
Cys	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Lys	Tyr	Cys	Asp	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu
	210					215					220				
Ser	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Asp	Glu	Cys
225					230				235						240
Ile	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro
				245					250					255	
His	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Ile	Pro	Trp	Gln	Cys	Ala
			260					265					270		
Cys	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr
		275					280					285			
Cys	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser
	290					295					300				
Gly	Pro	Lys	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Glu
305					310					315					320
His	Cys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Lys	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn
			325						330					335	
Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asn	Ser	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro
		340						345					350		
Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gln	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Thr	Cys	Ala
		355					360						365		
Asp	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly
	370				375						380				
Ser	Ser	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys
385					390				395						400
Glu	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly
			405						410					415	
Gln	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly
		420						425					430		
Phe	Thr	Gly	Thr	His	Cys	Glu	Leu	His	Ile	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Ser
		435					440					445			
Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Pro	Val
	450					455					460				
Cys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Ile
465					470				475						480
Thr	His	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Gly	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys
			485						490					495	
Tyr	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	Asn	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly
		500						505					510		
Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe
		515					520					525			
Pro	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Val
	530					535					540				
Leu	Leu	Val	Met	Val	Val	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg
545					550				555						560
Pro	Asp	Asp	Glu	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln
			565						570					575	
Lys	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys
		580						585					590		
Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys
		595					600					605			
Leu	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly
	610					615					620				

8074
78

Arg Gly Ser Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
625 630 635 640
Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
645 650 655
Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu
660 665 670
Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
675 680 685

<210> 5
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 039/039	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 60/836,003	(32) Fecha 07/08/2006	(33) País US
		(72) Inventor(es) STANLEY, J. WIEGAND Y OTROS	
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 07/03/2009		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14/02/2008
	Fecha de presentación de la solicitud: 07/08/2007		N° publicación: WO 2008/019144 A2
	No. de solicitud PCT/US2007/017546		
(54) Título: MÉTODOS TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS OCULARES VASCULARES CON ANTAGONISTAS DE DII4			

Reivindicación(es):

1. El uso de un agente capaz de inhibir la actividad de DII4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la inhibición o la mejora de un trastorno isquémico o vascular, en el que el antagonista de DII4 comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de bloquear la unión de DII4 a un receptor Notch, o comprende un fragmento de DII4, conectado opcionalmente a un componente de multimerización.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo hacia DII4 o el fragmento de anticuerpo es policlonal o monoclonal.
3. El uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es humanizado, quimérico, o es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo completamente humano.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno isquémico o vascular es una enfermedad o afección ocular que se caracteriza por la presencia de vasos sanguíneos anormales y/o por la pérdida de vasos sanguíneos normales o de la función de los vasos.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la enfermedad ocular es retinopatía de la prematuridad, retinopatía isquémica, oclusión venosa o arterial retiniana, retinopatía diabética, neovascularización coroidea, degeneración macular asociada a la edad, neovascularización corneal, glaucoma neovascular o trasplante de córnea.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto tratado es un ser humano.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno isquémico o vascular es una lesión isquémica, isquemia cerebral, isquemia cardiaca, afecciones isquémicas que afectan a las extremidades y a otros órganos o tejidos, malformaciones arteriovenosas, cicatrización de heridas, trasplante de órganos o tejidos, insuficiencia placentaria, estrechamiento y oclusión arterial, arteriosclerosis, e hipertensión sistémica o pulmonar.

76
82

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 16,800
FECHA : MARZO 2 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-022898- -00000-0000

Fecha: 2009-03-05 16:51:53 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19779045	02/03/2009	49,796,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
TOTAL :			\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 16813- 841-002-7



No. 09-022898- -00000-0000

Fecha: 2009-03-05 16:51:53 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Sandra Padilla
Firma Responsable

Fecha 14-05-09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
REGENERON PHARMACEUTICALS INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 22898
	Solicitud internacional	PCT/US2007/017546
	Fecha inicio fase nacional	07/03/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6210

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 05 JUN. 2009
jfernand