



Organización CSJ/111



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

OPS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

OK

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-31240

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR
CANCER

SOLICITANTE: ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC,

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

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 25 de Marzo de 2009

1/2

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-031240- -00000-0000

Fecha: 2009-03-26 17:14:29 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 392

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000041

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.

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

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta

TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/020889

Fecha

Septiembre 28, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/042236

Fecha

Abril 10, 2008

6

Título (54) COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR CANCER

Clasificación Internacional (51) C07K 16/00, C12P 21/08, C07H 21/04, C12N 15/00

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

Septiembre 29, 2006

Enero 23, 2007

Junio 7, 2007

(31) Número de Solicitud

60/847,904

60/886,260

60/942,542

9

Comprobante de pago No. 09-22,733

Fecha Marzo 24 de 2009

10

ANEXOS

2

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. (

☐

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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☒

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional, Secuencias.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

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

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2007/020889

1. **Austin GURNEY,**
496 Diamond Street,
San Francisco, CA 94114
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
2. **Timothy HOEY,**
200 Darrell Road,
Hillsborough, CA 94010
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
3. **Sanjeev SATYAL,**
965 Buckland Avenue,
San Carlos, CA 94070
Estados Unidos
Nacionalidad: India
4. **Fumiko AXELROD,**
3780 Wright Place,
Palo Alto, CA 94306
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-031240- -00000-0000

Fecha: 2009-03-26 17:14:29 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 392

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 22,733
FECHA : MARZO 24 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	110361134	20/03/2009	3,684,000.00

***** CONCEPTO *****

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

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 April 2008 (10.04.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/042236 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/020889

(22) International Filing Date:

28 September 2007 (28.09.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/847,904 29 September 2006 (29.09.2006) US
60/886,260 23 January 2007 (23.01.2007) US
60/942,542 7 June 2007 (07.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ON-COMED PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GURNEY, Austin** [US/US]; 496 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (US). **HOEY, Timothy** [US/US]; 200 Darrell Road, Hillsborough, CA 94010 (US). **SATYAL, Sanjeev** [IN/US]; 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (US). **AXEL-ROD, Fumiko** [US/US]; 3780 Wright Place, Palo Alto, CA 94306 (US).

(74) Agents: **MCCABE, Kevin, W.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:

31 July 2008

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR DIAGNOSING AND TREATING CANCER

(57) Abstract: An isolated antibody that specifically binds to an extracellular domain of human DLL4 and affects growth of a tumor comprising cancer stem cells is described. Also described is a method of treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-DLL4 antibody.

WO 2008/042236 A3

6

Compositions and Methods for Diagnosing and Treating Cancer

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Field

[001] The present invention relates to the field of oncology and provides novel compositions and methods for diagnosing and treating cancer. The present invention provides antibodies against a cancer stem cell marker for the diagnosis and treatment of solid tumors.

Background

[002] Cancer is one of the leading causes of death in the developed world, with over one million people diagnosed with cancer and 500,000 deaths per year in the United States alone. Overall it is estimated that more than 1 in 3 people will develop some form of cancer during their lifetime. There are more than 200 different types of cancer, four of which—breast, lung, colorectal, and prostate—account for over half of all new cases (Jemal et al., 2003, *Cancer J. Clin.* 53:5-26).

[003] Breast cancer is the most common cancer in women, with an estimate 12% of women at risk of developing the disease during their lifetime. Although mortality rates have decreased due to earlier detection and improved treatments, breast cancer remains a leading cause of death in middle-aged women, and metastatic breast cancer is still an incurable disease. On presentation, most patients with metastatic breast cancer have only one or two organ systems affected, but as the disease progresses, multiple sites usually become involved. The most common sites of metastatic involvement are locoregional recurrences in the skin and soft tissues of the chest wall, as well as in axilla and supraclavicular areas. The most common site for distant metastasis is the bone (30 - 40% of distant metastasis), followed by the lungs and liver. And although only approximately 1-5% of women with newly



diagnosed breast cancer have distant metastasis at the time of diagnosis, approximately 50% of patients with local disease eventually relapse with metastasis within five years. At present the median survival from the manifestation of distant metastases is about three years.

[004] Current methods of diagnosing and staging breast cancer include the tumor-node-metastasis (TNM) system that relies on tumor size, tumor presence in lymph nodes, and the presence of distant metastases (American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5th ed., 1997, pp 171-180; Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" in Harris, J. R., Hellman, S.; Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases. Philadelphia, Lippincott, 1991). These parameters are used to provide a prognosis and select an appropriate therapy. The morphologic appearance of the tumor can also be assessed but because tumors with similar histopathologic appearance can exhibit significant clinical variability, this approach has serious limitations. Finally assays for cell surface markers can be used to divide certain tumors types into subclasses. For example, one factor considered in the prognosis and treatment of breast cancer is the presence of the estrogen receptor (ER) as ER-positive breast cancers typically respond more readily to hormonal therapies such as tamoxifen or aromatase inhibitors than ER-negative tumors. Yet these analyses, though useful, are only partially predictive of the clinical behavior of breast tumors, and there is much phenotypic diversity present in breast cancers that current diagnostic tools fail to detect and current therapies fail to treat.

[005] Prostate cancer is the most common cancer in men in the developed world, representing an estimated 33% of all new cancer cases in the U.S., and is the second most frequent cause of death (Jemal et al., 2003, *CA Cancer J. Clin.* 53:5-26). Since the introduction of the prostate specific antigen (PSA) blood test, early detection of prostate cancer has dramatically improved survival rates; the five year survival rate for patients with local and regional stage prostate cancers at the time of diagnosis is nearing 100%. Yet more



than 50% of patients will eventually develop locally advanced or metastatic disease (Muthuramalingam et al., 2004, *Clin. Oncol.* 16:505-16).

[006] Currently radical prostatectomy and radiation therapy provide curative treatment for the majority of localized prostate tumors. However, therapeutic options are very limited for advanced cases. For metastatic disease, androgen ablation with luteinising hormone-releasing hormone (LHRH) agonist alone or in combination with anti-androgens is the standard treatment. Yet despite maximal androgen blockage, the disease nearly always progresses with the majority developing androgen-independent disease. At present there is no uniformly accepted treatment for hormone refractory prostate cancer, and chemotherapeutic regimes are commonly used (Muthuramalingam et al., 2004, *Clin. Oncol.* 16:505-16; Trojan et al., 2005, *Anticancer Res.* 25:551-61).

[007] Colorectal cancer is the third most common cancer and the fourth most frequent cause of cancer deaths worldwide (Weitz et al., 2005, *Lancet* 365:153-65). Approximately 5-10% of all colorectal cancers are hereditary with one of the main forms being familial adenomatous polyposis (FAP), an autosomal dominant disease in which about 80% of affected individuals contain a germline mutation in the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Colorectal carcinomas invade locally by circumferential growth and elsewhere by lymphatic, hematogenous, transperitoneal, and perineural spread. The most common site of extralymphatic involvement is the liver, with the lungs the most frequently affected extra-abdominal organ. Other sites of hematogenous spread include the bones, kidneys, adrenal glands, and brain.

[008] The current staging system for colorectal cancer is based on the degree of tumor penetration through the bowel wall and the presence or absence of nodal involvement. This staging system is defined by three major Duke's classifications: Duke's A disease is confined to submucosa layers of colon or rectum; Duke's B disease has tumors that invade



through the muscularis propria and may penetrate the wall of the colon or rectum; and Duke's C disease includes any degree of bowel wall invasion with regional lymph node metastasis. While surgical resection is highly effective for early stage colorectal cancers, providing cure rates of 95% in Duke's A patients, the rate is reduced to 75% in Duke's B patients and the presence of positive lymph node in Duke's C disease predicts a 60% likelihood of recurrence within five years. Treatment of Duke's C patients with a post surgical course of chemotherapy reduces the recurrence rate to 40%-50% and is now the standard of care for these patients.

[009] Lung cancer is the most common cancer worldwide, the third most commonly diagnosed cancer in the United States, and by far the most frequent cause of cancer deaths (Spiro et al., 2002, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-96; Jemal et al., 2003, *CA Cancer J. Clin.* 53:5-26). Cigarette smoking is believed responsible for an estimated 87% of all lung cancers making it the most deadly preventable disease. Lung cancer is divided into two major types that account for over 90% of all lung cancers: small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). SCLC accounts for 15-20% of cases and is characterized by its origin in large central airways and histological composition of sheets of small cells with little cytoplasm. SCLC is more aggressive than NSCLC, growing rapidly and metastasizing early. NSCLC accounts for 80-85% of all cases and is further divided into three major subtypes based on histology: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma (epidermoid carcinoma), and large cell undifferentiated carcinoma.

[010] Lung cancer typically presents late in its course, and thus has a median survival of only 6-12 months after diagnosis and an overall 5 year survival rate of only 5-10%. Although surgery offers the best chance of a cure, only a small fraction of lung cancer patients are eligible with the majority relying on chemotherapy and radiotherapy. Despite attempts to manipulate the timing and dose intensity of these therapies, survival rates have

increased little over the last 15 years (Spiro et al., 2002, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-96).

[011] These four cancers, as well as many others, present as solid tumors that are composed of heterogeneous cell populations. For example, breast cancers are a mixture of cancer cells and normal cells, including mesenchymal (stromal) cells, inflammatory cells, and endothelial cells. Several models of cancer provide different explanations for the presence of this heterogeneity. One model, the classic model of cancer, holds that phenotypically distinct cancer cell populations all have the capacity to proliferate and give rise to a new tumor. In the classical model, tumor cell heterogeneity results from environmental factors as well as ongoing mutations within cancer cells resulting in a diverse population of tumorigenic cells. This model rests on the idea that all populations of tumor cells have some degree of tumorigenic potential. (Pandis et al., 1998, *Genes, Chromosomes & Cancer* 12:122-129; Kuukasjrvi et al., 1997, *Cancer Res.* 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, *Cancer* 71:382-391; Bonsing et al., 2000, *Genes Chromosomes & Cancer* 82: 173-183; Beerman H et al., 1991, *Cytometry* 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, *Analyt. Cell. Path.* 19:53; Shen L et al., 2000, *Cancer Res.* 60:3884).

[012] An alternative model for the observed solid tumor cell heterogeneity derives from the impact of stem cells on tumor development. According to this model, cancer arises from dysregulation of the mechanisms that control normal tissue development and maintenance. (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324). During normal animal development, cells of most or all tissues are derived from normal precursors, called stem cells (Morrison et al., 1997, *Cell* 88:287-98; Morrison et al., 1997, *Curr. Opin. Immunol.* 9:216-21; Morrison et al., 1995, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35-71). Stem cells are cells that: (1) have extensive proliferative capacity; 2) are capable of asymmetric cell division to generate one or more kinds of progeny with reduced proliferative and/or developmental potential; and (3) are

capable of symmetric cell divisions for self-renewal or self-maintenance. The best-studied example of adult cell renewal by the differentiation of stem cells is the hematopoietic system where developmentally immature precursors (hematopoietic stem and progenitor cells) respond to molecular signals to form the varied blood and lymphoid cell types. Other cells, including cells of the gut, breast ductal system, and skin are constantly replenished from a small population of stem cells in each tissue, and recent studies suggest that most other adult tissues also harbor stem cells, including the brain. Tumors derived from a "solid tumor stem cell" (or "cancer stem cell" from a solid tumor) subsequently undergoes chaotic development through both symmetric and asymmetric rounds of cell divisions. In this stem cell model, solid tumors contain a distinct and limited (possibly even rare) subset of cells that share the properties of normal "stem cells", in that they extensively proliferate and efficiently give rise both to additional solid tumor stem cells (self-renewal) and to the majority of tumor cells of a solid tumor that lack tumorigenic potential. Indeed, mutations within a long-lived stem cell population may initiate the formation of cancer stem cells that underlie the growth and maintenance of tumors and whose presence contributes to the failure of current therapeutic approaches.

[013] The stem cell nature of cancer was first revealed in the blood cancer, acute myeloid leukemia (AML) (Lapidot et al., 1994, *Nature* 17:645-8). More recently it has been demonstrated that malignant human breast and colon tumors similarly harbor a small, distinct population of cancer stem cells enriched for the ability to form tumors in immunodeficient mice. An ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- cell population in breast tumors was found to be 50-fold enriched for tumorigenic cells compared to unfractionated tumor cells (Al-Hajj et al., 2003, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 100:3983-8). Similarly, the ESA+, CD44+ subpopulation in colorectal tumors was found to uniquely include tumorigenic cells, and the addition of CD166 to this profile was able to further enrich for colon cancer stem cells (CoCSC)

(2)

(Dalerba et al. 2007 *Proc Nat'l Acad Sci* 104:10158-63). The ability to prospectively isolate the tumorigenic cancer cells has permitted investigation of critical biological pathways that underlie tumorigenicity in these cells, and thus promises the development of better diagnostic assays and therapeutics for cancer patients. It is toward this purpose that this invention is directed.

SUMMARY

[014] Provided are antibodies that specifically bind to a human Delta-like ligand 4 (DLL4) epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL domain (SEQ ID NO: 26), wherein the antibody affects tumor growth. Also provided is a pharmaceutical composition comprising an antibody of the present disclosure and a pharmaceutically acceptable vehicle. Further provided is a method of treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of a DLL4 antibody of the present disclosure.

[015] Additional objects and advantages of the invention will be set forth in part in the description which follows, and in part will be obvious from the description, or may be learned by practice of the invention. The objects and advantages of the invention will be realized and attained by means of the elements and combinations particularly pointed out in the appended claims. It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention, as claimed. The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of this specification, illustrate several embodiments of the invention and, together with the description, serve to explain the principles of the invention. In the specification and the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise.



BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[016] Figure 1: Specific Binding of anti-DLL4 21M18 Antibodies to Native Cell-Surface DLL4 Protein. HEK 293 cells co-transfected with full-length DLL4 and GFP were incubated with anti-DLL4 antibodies and sorted by FACS. Anti-DLL4 antibodies 21M14 and 21M18 show specific binding to cells expressing DLL4 as revealed by the linear relationship between DLL4 antibody binding and GFP expression.

[017] Figure 2: DLL4 Antibodies Block the Interaction of Human DLL4 with the Notch Receptor. A) HEK 293 cells expressing DLL4 were incubated with Notch-Fc or control Fc protein in the presence of DLL4 or control antibodies. High fluorescence intensity indicates the presence of Notch and DLL4 binding in the presence of a control antibody (line 2) and 21M12 anti-DLL4 antibodies (line 5). Low fluorescence intensity indicates the absence of Notch and DLL4 interactions in the absence of Notch (line 1) and the disruption of Notch and DLL4 interactions in the presence of anti-DLL4 antibodies 21M18 (line 3) and 21M14 (line 4). B) HEK 293 cells expressing Notch1 were incubated with either human or murine DLL4-Fc. Binding was detected by fluorescently labeled anti-Fc and analyzed by FACS, with high fluorescence intensity indicative of binding between DLL4 and Notch1 expressing cells. 21M18 blocks binding of human DLL4 (gray squares) but not murine DLL4 (black circles) to the Notch receptor.

[018] Figure 3: Epitope Mapping of Anti-DLL4 Antibodies. A) Fusion proteins with nested deletions of the extracellular domain of human DLL4 were incubated in an ELISA assay with 21M14 and 21M18 anti-DLL4 antibodies. No binding above background was detected in the presence of fusion proteins containing between amino acids 1 to 154 (aa 1-96, white bar with black dots; aa 1-154, black bar with white dots). In contrast, binding was detected between anti-DLL4 antibodies and all fusion proteins containing between amino acids 1 to 217, including the DSL domain, of DLL4 (aa 1-217, horizontal striped bar; aa 1-

14

251, diagonal striped bar; aa 1-283, hatched bar; aa 1-323, gray bar with white dots). B) Western blots show expression of human DLL4 (h-DLL4) C-terminal deletion proteins and murine-human DLL4 chimeric fusion proteins (anti-hFc; top). The DLL4 fusion proteins comprise one or more of domains 1 to 6, where domains 1 and 2 are N-terminal amino acids 1 to 154; domain 3 is the DSL domain from amino acids 155 to 217; and domains 4, 5, and 6 are each an EGF domain as depicted graphically in C. 21M18 antibodies recognize h-DLL4 protein only in the presence of amino acids 1-217 (hDLL4dom1-3). In contrast to the human protein, fusion proteins comprising murine DLL4 (m-DLL4) amino acids 1-217 (dom1-3) are not recognized by 21M18 (m-DLL4 dom1-3:h-DLL4dom4-6). Yet fusion proteins comprising h-DLL4 amino acids 1-154 (dom1-2) in the presence of murine dom3 are recognized by 21M18 (h-DLL4 dom1-2:mDLL4dom3-6). C) A schematic summary of the binding data of B is shown. The domain structure of DLL4 is shown at top with the DLL4 fusion proteins listed and shown schematically on the left side with human protein represented by light gray and mouse protein represented by dark gray. 21M18 binding to each DLL4 fragment is indicated by a "+" versus a "-". D) ELISA analysis of 21M18 binding to DLL4 protein fragments containing substitution of corresponding murine residues for human residues at select positions. 21M18 displays impaired binding to DLL4 protein fragments with substitutions at amino acids 68, 69, and 71 (replacement of valine, valine, and proline) or at amino acids 142 and 144 (replacement of lysine and alanine). E) ELISA analysis of the binding of antibodies 21M18 and 21M21 to DLL4 protein fragments containing substitution of corresponding murine residues for human residues at select positions within the DSL domain. Antibody 21M21 displays impaired binding to human DLL4 protein fragments containing amino acid substitutions at amino acids 161 and 162 (replacement of threonine and serine). As 21M21 does not impair DLL4 function in

S

signaling assays (see Figure 6), this demonstrates that not all antibodies that bind to the DSL region impact DLL4 function.

[019] Figure 4: Sequence alignment of the heavy chain variable region. A) Parental murine 21M18 antibody sequence (m-21M18-Vh, top) human expressed framework sequence (h-EST-framework, middle) and the humanized 21M18 heavy chain variable region sequence (21M18- H7, bottom) are shown with conserved amino acid residues shaded in black. The three CDRs are marked showing retention of parental murine sequences in the humanized 21M18 antibody. The cysteine residue at Kabat position 52a in CDR2 has been changed to a serine and a valine residue without loss of specific binding to Dll4 in 21M18 H7 and 21M18 H9, respectively. Substitutions within the framework region shown in 4A are numbered 1-6 with corresponding Kabat positions in the Vh chain 16, 20, 27, 28, 38, 48. B) Parental murine 21M18 antibody sequence (m-21M18-Vh, top), human germline Vh sequence (h-germline-Vh, middle), and the humanized 21M18 heavy chain variable region sequence (21M18- H2, bottom) are shown with conserved amino acid residues shaded in black. The three CDRs are marked showing retention of parental murine sequences in the humanized 21M18 antibody. The cysteine residue at Kabat position 52a in CDR2 has been changed to a serine and a valine residue without loss of specific binding to Dll4 in 21M18 H7 and 21M18 H9, respectively. The five retained murine residues within the variable framework region of all heavy chain variants are numbered 1-5 at their corresponding Kabat positions 20, 28, 38, 48, and 69.

[020] Figure 5: Sequence alignment of the light chain variable region. Parental murine 21M18 antibody sequence (m-21M18-Vk, top), human germline sequence (h-germline Vk, bottom), and humanized 21M18 light chain variable region sequence (21M18-L2, middle) are shown with conserved amino acid residues shaded in black. The three CDRs are marked showing retention of parental murine sequences in the humanized 21M18

/ 6

antibody. The two retained murine residues within the variable framework region are numbered 1-2 at their corresponding Kabat positions 22 and 36.

[021] Figure 6: DLL4 Antibodies Block Notch Signaling. HeLa cells co-transfected with Hes1-Luc reporter and Renilla luciferase reporter vectors were incubated with DLL4-Fc protein in the presence or absence of anti-DLL4 antibodies. Decreased luciferase levels demonstrate loss of DLL4 Notch pathway activation by 21M14 and 21M18 antibodies.

[022] Figure 7: DLL4 Antibodies Modulate Expression of Notch Target Genes in Colon Tumors. A) C8 colon tumors treated with anti-DLL4 21M18 antibodies or PBS (Control) were isolated and expression of HES1 and ATOH-1 determined by quantitative RT-PCR. Relative gene expression (y-axis) compared to control treated cells shows that treatment with anti-DLL4 antibodies decreased expression of HES1 and increased expression of ATOH-1. B) Relative expression ratio (y-axis) of HES1 versus ATOH1 in mouse lineage-depleted OMP-C11 colon tumor cell colonies is shown. C11 colonies overlaid with 3T3 cells overexpressing DLL4 (3T3+DLL4) showed an increased in the HES1/ATOH1 expression ratio compared to colon cells overlaid with 3T3 cells (3T3) or not exposed to cell overlay (Control). This increase in the HES1/ATOH1 expression ratio was eliminated by incubation with 10 ug/mL 21M18 antibodies (21M18) or 5 uM-secretase inhibitor DBZ (5 uM GSI).

[023] Figure 8: DLL4 Antibodies Reduce Tumor Growth. NOD/SCID mice were injected with dissociated UM-C4 cells and treated with anti-DLL4 21M18 antibodies (n=5) or PBS (n=10). Treatment with 21M18 antibodies (diamonds) reduced tumor growth starting on day 23, and up to 54% reduction was observed by day 48 compared to PBS injected controls (black squares).

[024] Figure 9: Treatment with DLL4 Antibodies Reduces the Number of Proliferating Tumor Cells in Vivo. C8 Colon tumors treated with anti-DLL4 21M18

antibodies or control Ab were isolated. Immunocytochemistry with an antibody against Ki67 showed a reduction in the number of proliferating cells in 21M18 treated tumors compared to control.

[025] Figure 10: Treatment with DLL4 Antibodies in Combination with Fluorouracil (5-FU) Reduces Tumor Growth. NOD/SCID mice were injected with dissociated UM-C4 cells and treated with anti-DLL4 antibodies or PBS in the presence or absence of 5-FU. A) Treatment with 21M18 antibodies in combination with 5-FU (circles, dashed line) reduced tumor growth 46 days after injection of tumor cells to a greater degree than treatment with either 5-FU (triangles, solid line) or 21M18 antibodies (diamonds, dotted line) alone and to a greater degree than PBS injected controls (squares, solid line). Tumor volume in mm^3 is indicated on the y-axis. B) Plots of tumor measurements on day 46 from individual animals. Each dot represents one animal. Treatment with 21M18 antibodies or 5-FU each reduced tumor size (mm^3) compared to control. Furthermore, combination treatment with 21M18 antibodies and 5-FU had an additive effect, reducing tumor size to 1/5 the size of control.

[026] Figure 11: Treatment with DLL4 Antibodies in Combination with anti-EGFR Antibodies Reduces Tumor Growth. NOD/SCID mice were injected with dissociated UM-C4 cells and treated with anti-DLL4 antibodies or PBS in the presence or absence of anti-EGFR antibodies. Plots of tumor measurements on day 46 from individual animals are shown. Each dot represents one animal. Treatment with 21M18 antibodies or anti-EGFR antibodies each reduced tumor size (mm^3) compared to control. Furthermore, combination treatment with 21M18 and anti-EGFR antibodies had an additive effect, reducing tumor size to less than 1/5 the size of control.

[027] Figure 12: Anti-DLL4 mAb 21M18 and Irinotecan Act Synergistically to Inhibit Colon Tumor Growth. NOD/SCID mice were injected with dissociated C8 cells and

treated with anti-DLL4 antibodies or control antibody in the presence or absence of Irinotecan. A) Treatment with murine 21M18 antibodies (circles) or Irinotecan (triangles) alone each reduced tumor volume (y-axis mm^3) compared to control treated animals (black squares). However, combination treatment with 21M18 and Irinotecan (inverse triangles) had a synergistic effect, completely eliminating tumor growth for up to 55 days post-cell injection. B) Treatment with humanized 21M18 (h21M18) in combination with Irinotecan (irtn) (circles) has similar efficacy as murine 21M18 (m21M18) (triangles) as compared to control antibody (black squares) or control antibody with Irinotecan (triangles).

[028] Figure 13: Combination Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Treatment Prevents Colon Tumor Re-Growth. NOD/SCID mice were injected with dissociated C8 cells and treated with Irinotecan or Irinotecan in combination with anti-DLL4 21M18 antibodies (n=10 per group). A) Treatment with Irinotecan alone slowed colon tumor growth, but growth continued after cessation of treatment on day 56 (* arrow) in all but two treated animals. B) In contrast, treatment with a combination of Irinotecan and anti-DLL4 21M18 antibodies eliminated colon tumor growth both during treatment and for up to five weeks following cessation of treatment on day 56 in all ten treated animals. Each line represents the growth curve for an individual animal.

[029] Figure 14: Combination Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Treatment Inhibits the Growth of Established Colon Tumors More Effectively than Single Therapy Treatment. NOD/SCID mice were injected with dissociated C8 cells and treated with anti-DLL4 antibodies or control antibody in the presence or absence of Irinotecan. Treatment with 21M18 antibodies (diamonds) or Irinotecan (triangles) alone each reduced tumor volume (y-axis mm^3) compared to control treated animals (black squares). However, combination treatment with 21M18 plus Irinotecan (inverse triangles) inhibited tumor growth more effectively than either 21M18 or Irinotecan treatment alone.

[030] Figure 15: Tumors Treated with Anti-DLL4 Antibodies Show Decreased Numbers of Tumorigenic Cells. Immunocompromised mice ($n = 10$ per group) were injected with decreasing dosages of tumor cells from the experiment shown in Figure 14 that had been treated with either control antibody, Irinotecan plus control antibody, DLL4 21M18 antibodies alone, or a combination of DLL4 21M18 antibodies and Irinotecan (Combination). A) Results of tumor take rates on day 81. Tumor volume (mm^3) was graphed compared to the number of human tumor cells injected: 900, 300, 100, and 50 for each treatment group. The number of animals with detectable tumors over the total injected animals for each tumor cell dose is recorded below the graph of tumor volume for each cell dose with control treated tumor cells on the left (filled circles), anti-DLL4 21M18 antibody treated tumor cells second to the left (open squares), Irinotecan treated tumor cells second to the right (filled triangles), and Combination treated tumor cells on the right (open circles). B) The stem cell frequency on day 81 was calculated. The proportion of cancer stem cells (y-axis) from control treated (left) compared to anti-DLL4 treated (second from left), Irinotecan only treated (second from right), and Combination treated (right) tumor cells is plotted with the 95% confidence interval. The anti-DLL4 treated group has a statistically significant difference versus the control group (*) and the combination group is significantly different versus both the control (*) and Irinotecan alone groups(**).

[031] Figure 16: Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Combination Treatment Delays Tumor Recurrence. Immunocompromised mice were injected with dissociated C8 cells and established tumors of approximately 150 mm^3 were treated with a combination of Irinotecan (45 mg/kg, dosed twice a week) with either anti-DLL4 21M18 antibodies or control antibodies for 32 days after which Irinotecan treatment was halted. Treatment with either the control antibody or 21M18 continued. Reoccurrence of tumors by tumor volume (y-axis) was delayed in 21M18 treated animals (triangles) as compared to controls (circles).



[032] Figure 17: Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Combination Treatment Delays Tumor Recurrence. The individual animals from the experiment shown in Figure 16 are shown. The total tumor volume (y-axis) of each animal is shown 47 days after termination of Irinotecan treatment.

[033] Figure 18. Anti-DLL4 21M18 and anti-VEGF combination reduces tumor growth. C17 tumor cells were implanted and treatment was initiated two day later with either control antibody (black squares, solid line), 21M18 (triangles, dashed line), anti-VEGF (diamonds, solid line), or the combination of both antibodies (circles, dotted line). Each antibody was dosed at 10 mg/kg, given twice a week and there were 10 animals per group. Both 21M18 and anti-VEGF reduced tumor growth and the combination was more effective than either single antibody.

DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS

[034] The term "antibody" is used to mean an immunoglobulin molecule that recognizes and specifically binds to a target, such as a protein, polypeptide, peptide, carbohydrate, polynucleotide, lipid, or combinations of the foregoing through at least one antigen recognition site within the variable region of the immunoglobulin molecule. In certain embodiments, antibodies of the present invention include antagonist antibodies that specifically bind to a cancer stem cell marker protein and interfere with, for example, ligand binding, receptor dimerization, expression of a cancer stem cell marker protein, and/or downstream signaling of a cancer stem cell marker protein. In certain embodiments, disclosed antibodies include agonist antibodies that specifically bind to a cancer stem cell marker protein and promote, for example, ligand binding, receptor dimerization, and/or signaling by a cancer stem cell marker protein. In certain embodiments, disclosed antibodies do not interfere with or promote the biological activity of a cancer stem cell marker protein but inhibit tumor growth by, for example, antibody internalization and/or recognition by the

immune system. As used herein, the term "antibody" encompasses intact polyclonal antibodies, intact monoclonal antibodies, antibody fragments (such as Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments), single chain Fv (scFv) mutants, multispecific antibodies such as bispecific antibodies generated from at least two intact antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, human antibodies, fusion proteins comprising an antigen determination portion of an antibody, and any other modified immunoglobulin molecule comprising an antigen recognition site so long as the antibodies exhibit the desired biological activity. An antibody can be of any the five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, or subclasses (isotypes) thereof (e.g. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2), based on the identity of their heavy-chain constant domains referred to as alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The different classes of immunoglobulins have different and well known subunit structures and three-dimensional configurations. Antibodies can be naked or conjugated to other molecules such as toxins, radioisotopes, etc.

[035] As used herein, the term "antibody fragment" refers to a portion of an intact antibody and refers to the antigenic determining variable regions of an intact antibody.

Examples of antibody fragments include, but are not limited to Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments, linear antibodies, single chain antibodies, and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

[036] An "Fv antibody" refers to the minimal antibody fragment that contains a complete antigen-recognition and -binding site either as two-chains, in which one heavy and one light chain variable domain form a non-covalent dimer, or as a single-chain (scFv), in which one heavy and one light chain variable domain are covalently linked by a flexible peptide linker so that the two chains associate in a similar dimeric structure. In this configuration the complementarity determining regions (CDRs) of each variable domain interact to define the antigen-binding specificity of the Fv dimer. Alternatively a single

variable domain (or half of an Fv) can be used to recognize and bind antigen, although generally with lower affinity.

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

[038] As used herein, the term "humanized antibody" refers to forms of non-human (e.g. murine) antibodies that are specific immunoglobulin chains, chimeric immunoglobulins, or fragments thereof that contain minimal non-human sequences. Typically, humanized antibodies are human immunoglobulins in which residues from the complementarity determining regions (CDRs) within the antigen determination region (or hypervariable region) of the variable region of an antibody chain or chains are replaced by residues from the CDR of a non-human species (e.g. mouse, rat, rabbit, hamster) that have the desired specificity, affinity, and capability. In some instances, residues from the variable chain framework region (FR) of a human immunoglobulin are replaced with the corresponding residues in an antibody from a non-human species that has the desired specificity, affinity, and capability. The humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residue either in the variable framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or

23

capability. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two or three or four, variable domains containing all or substantially all of the CDR regions that correspond to the non-human immunoglobulin whereas all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Examples of methods used to generate humanized antibodies are described in U.S. Pat. 5,225,539.

[039] The term "human antibody" as used herein means an antibody produced by a human or an antibody having an amino acid sequence corresponding to an antibody produced by a human made using any technique known in the art. This definition of a human antibody includes intact or full-length antibodies, fragments thereof, and/or antibodies comprising at least one human heavy and/or light chain polypeptide such as, for example, an antibody comprising murine light chain and human heavy chain polypeptides.

[040] "Hybrid antibodies" are immunoglobulin molecules in which pairs of heavy and light chains from antibodies with different antigenic determinant regions are assembled together so that two different epitopes or two different antigens can be recognized and bound by the resulting tetramer.

[041] The term "chimeric antibodies" refers to antibodies wherein the amino acid sequence of the immunoglobulin molecule is derived from two or more species. Typically, the variable region of both light and heavy chains corresponds to the variable region of antibodies derived from one species of mammals (e.g. mouse, rat, rabbit, etc) with the desired specificity, affinity, and capability while the constant regions are homologous to the sequences in antibodies derived from another (usually human) to avoid eliciting an immune response in that species.

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

[043] Competition between antibodies is determined by an assay in which the immunoglobulin under test inhibits specific binding of a reference antibody to a common antigen. Numerous types of competitive binding assays are known, for example: solid phase direct or indirect radioimmunoassay (RIA), solid phase direct or indirect enzyme immunoassay (EIA), sandwich competition assay (see Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)); solid phase direct biotin-avidin EIA (see Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); solid phase direct labeled assay, solid phase direct labeled sandwich assay (see Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press (1988)); solid phase direct label RIA using I-125 label (see Morel et al., *Molec. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)); solid phase direct biotin-avidin EIA (Cheung et al., *Virology* 176:546-552 (1990)); and direct labeled RIA (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)). Typically, such an assay involves the use of purified antigen bound to a solid surface or cells bearing either of these, an unlabeled test immunoglobulin and a labeled reference immunoglobulin. Competitive inhibition is measured by determining the amount of label bound to the solid surface or cells in the presence of the test immunoglobulin. Usually the test immunoglobulin is present in excess. Antibodies identified by competition assay (competing antibodies) include antibodies binding to the same epitope as the reference

antibody and antibodies binding to an adjacent epitope sufficiently proximal to the epitope bound by the reference antibody for steric hindrance to occur. Usually, when a competing antibody is present in excess, it will inhibit specific binding of a reference antibody to a common antigen by at least 50 or 75%.

[044] That an antibody "selectively binds" or "specifically binds" means that the antibody reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration, with greater affinity, or with some combination of the above to an epitope than with alternative substances, including unrelated proteins. "Selectively binds" or "specifically binds" means, for instance, that an antibody binds to a protein with a K_D of at least about 0.1 mM, but more usually at least about 1 μ M. "Selectively binds" or "specifically binds" means at times that an antibody binds to a protein at times with a K_D of at least about 0.1 μ M or better, and at other times at least about 0.01 μ M or better. Because of the sequence identity between homologous proteins in different species, specific binding can include an antibody that recognizes a cancer stem cell marker protein in more than one species.

[045] As used herein, the terms "non-specific binding" and "background binding" when used in reference to the interaction of an antibody and a protein or peptide refer to an interaction that is not dependent on the presence of a particular structure (i.e., the antibody is binding to proteins in general rather than a particular structure such as an epitope).

[046] The terms "isolated" or "purified" refer to material that is substantially or essentially free from components that normally accompany it in its native state. Purity and homogeneity are typically determined using analytical chemistry techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis or high performance liquid chromatography. A protein (e.g. an antibody) or nucleic acid of the present disclosure that is the predominant species present in a preparation is substantially purified. In particular, an isolated nucleic acid is separated from open reading frames that naturally flank the gene and encode proteins other



than protein encoded by the gene. An isolated antibody is separated from other non-immunoglobulin proteins and from other immunoglobulin proteins with different antigen binding specificity. It can also mean that the nucleic acid or protein is in some embodiments at least 80% pure, in some embodiments at least 85% pure, in some embodiments at least 90% pure, in some embodiments at least 95% pure, and in some embodiments at least 99% pure.

[047] As used herein, the terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals in which a population of cells are characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancers.

[048] The terms "proliferative disorder" and "proliferative disease" refer to disorders associated with abnormal cell proliferation such as cancer.

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

[050] "Metastasis" as used herein refers to the process by which a cancer spreads or transfers from the site of origin to other regions of the body with the development of a similar cancerous lesion at the new location. A "metastatic" or "metastasizing" cell is one

that loses adhesive contacts with neighboring cells and migrates via the bloodstream or lymph from the primary site of disease to invade neighboring body structures.

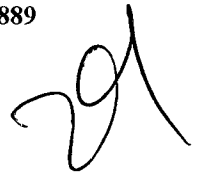
[051] The terms "cancer stem cell", "tumor stem cell", or "solid tumor stem cell" are used interchangeably herein and refer to a population of cells from a solid tumor that: (1) have extensive proliferative capacity; 2) are capable of asymmetric cell division to generate one or more kinds of differentiated progeny with reduced proliferative or developmental potential; and (3) are capable of symmetric cell divisions for self-renewal or self-maintenance. These properties of "cancer stem cells", "tumor stem cells" or "solid tumor stem cells" confer on those cancer stem cells the ability to form palpable tumors upon serial transplantation into an immunocompromised mouse compared to the majority of tumor cells that fail to form tumors. Cancer stem cells undergo self-renewal versus differentiation in a chaotic manner to form tumors with abnormal cell types that can change over time as mutations occur. Solid tumor stem cells differ from the "cancer stem line" provided by U.S. Pat. No. 6,004,528. In that patent, the "cancer stem line" is defined as a slow growing progenitor cell type that itself has few mutations but which undergoes symmetric rather than asymmetric cell divisions as a result of tumorigenic changes that occur in the cell's environment. This "cancer stem line" hypothesis thus proposes that highly mutated, rapidly proliferating tumor cells arise largely as a result of an abnormal environment, which causes relatively normal stem cells to accumulate and then undergo mutations that cause them to become tumor cells. U.S. Pat. No. 6,004,528 proposes that such a model can be used to enhance the diagnosis of cancer. The solid tumor stem cell model is fundamentally different from the "cancer stem line" model and as a result exhibits utilities not offered by the "cancer stem line" model. First, solid tumor stem cells are not "mutationally spared". The "mutationally spared cancer stem line" described by U.S. Pat. No. 6,004,528 can be considered a pre-cancerous lesion, while solid tumor stem cells are cancer cells that may



themselves contain the mutations that are responsible for tumorigenesis starting at the pre-cancerous stage through later stage cancer. That is, solid tumor stem cells ("cancer stem cells") would be included among the highly mutated cells that are distinguished from the "cancer stem line" in U.S. Pat. No. 6,004,528. Second, the genetic mutations that lead to cancer can be largely intrinsic within the solid tumor stem cells as well as being environmental. The solid tumor stem cell model predicts that isolated solid tumor stem cells can give rise to additional tumors upon transplantation (thus explaining metastasis) while the "cancer stem line" model would predict that transplanted "cancer stem line" cells would not be able to give rise to a new tumor, since it was their abnormal environment that was tumorigenic. Indeed, the ability to transplant dissociated, and phenotypically isolated human solid tumor stem cells to mice (into an environment that is very different from the normal tumor environment) where they still form new tumors distinguishes the present invention from the "cancer stem line" model. Third, solid tumor stem cells likely divide both symmetrically and asymmetrically, such that symmetric cell division is not an obligate property. Fourth, solid tumor stem cells can divide rapidly or slowly, depending on many variables, such that a slow proliferation rate is not a defining characteristic.

[052] The terms "cancer cell", "tumor cell" and grammatical equivalents refer to the total population of cells derived from a tumor or a pre-cancerous lesion including both non-tumorigenic cells, which comprise the bulk of the tumor cell population, and tumorigenic stem cells (cancer stem cells).

[053] As used herein "tumorigenic" refers to the functional features of a solid tumor stem cell including the properties of self-renewal (giving rise to additional tumorigenic cancer stem cells) and proliferation to generate all other tumor cells (giving rise to differentiated and thus non-tumorigenic tumor cells) that allow solid tumor stem cells to form a tumor.



[054] As used herein, the terms "stem cell cancer marker(s)", "cancer stem cell marker(s)", "tumor stem cell marker(s)", or "solid tumor stem cell marker(s)" refer to a gene or genes or a protein, polypeptide, or peptide expressed by the gene or genes whose expression level, alone or in combination with other genes, is correlated with the presence of tumorigenic cancer cells compared to non-tumorigenic cells. The correlation can relate to either an increased or decreased expression of the gene (e.g. increased or decreased levels of mRNA or the peptide encoded by the gene).

[055] As used herein, the terms "biopsy" or "biopsy tissue" refer to a sample of tissue or fluid that is removed from a subject for the purpose of determining if the sample contains cancerous tissue. In some embodiments, biopsy tissue or fluid is obtained because a subject is suspected of having cancer, and the biopsy tissue or fluid is then examined for the presence or absence of cancer.

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

[057] "Pharmaceutically acceptable" refers to approved or approvable by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans.

[058] "Pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt of a compound that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound.

[059] "Pharmaceutically acceptable excipient, carrier or adjuvant" refers to an excipient, carrier or adjuvant that can be administered to a subject, together with at least one antibody of the present disclosure, and which does not destroy the pharmacological activity

thereof and is nontoxic when administered in doses sufficient to deliver a therapeutic amount of the compound.

[060] "Pharmaceutically acceptable vehicle" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or carrier with which at least one antibody of the present disclosure is administered.

[061] "Prodrug" refers to a derivative of a therapeutically effective compound that requires a transformation within the body to produce the therapeutically effective compound. Prodrugs can be pharmacologically inactive until converted to the therapeutically effective parent compound.

[062] The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of an antibody, polypeptide, polynucleotide, small organic molecule, or other drug effective to "treat" a disease or disorder in a subject or mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug can reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit or stop cancer cell infiltration into peripheral organs including, for example, the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibit and stop tumor metastasis; inhibit and stop tumor growth; relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer, reduce morbidity and mortality; improve quality of life; or a combination of such effects. To the extent the drug prevents growth and/or kills existing cancer cells, it can be referred to as cytostatic and/or cytotoxic.

[063] As used herein, "providing a diagnosis" or "diagnostic information" refers to any information, including for example the presence of cancer stem cells, that is useful in determining whether a patient has a disease or condition and/or in classifying the disease or condition into a phenotypic category or any category having significance with regards to the prognosis of or likely response to treatment (either treatment in general or any particular treatment) of the disease or condition. Similarly, diagnosis refers to providing any type of diagnostic information, including, but not limited to, whether a subject is likely to have a



condition (such as a tumor), whether a subject's tumor comprises cancer stem cells, information related to the nature or classification of a tumor as for example a high risk tumor or a low risk tumor, information related to prognosis and/or information useful in selecting an appropriate treatment. Selection of treatment can include the choice of a particular chemotherapeutic agent or other treatment modality such as surgery or radiation or a choice about whether to withhold or deliver therapy.

[064] As used herein, the terms "providing a prognosis", "prognostic information", or "predictive information" refer to providing information, including for example the presence of cancer stem cells in a subject's tumor, regarding the impact of the presence of cancer (e.g., as determined by the diagnostic methods of the present invention) on a subject's future health (e.g., expected morbidity or mortality, the likelihood of getting cancer, and the risk of metastasis).

[065] Terms such as "treating" or "treatment" or "to treat" or "alleviating" or "to alleviate" refer to both 1) therapeutic measures that cure, slow down, lessen symptoms of, and/or halt progression of a diagnosed pathologic condition or disorder and 2) prophylactic or preventative measures that prevent and/or slow the development of a targeted pathologic condition or disorder. Thus those in need of treatment include those already with the disorder; those prone to have the disorder; and those in whom the disorder is to be prevented.

A subject is successfully "treated" according to the methods of the present invention if the patient shows one or more of the following: a reduction in the number of or complete absence of cancer cells; a reduction in the tumor size; inhibition of or an absence of cancer cell infiltration into peripheral organs including, for example, the spread of cancer into soft tissue and bone; inhibition of or an absence of tumor metastasis; inhibition or an absence of tumor growth; relief of one or more symptoms associated with the specific cancer; reduced morbidity and mortality; improvement in quality of life; or some combination of effects.

32

[066] As used herein, the terms "polynucleotide" or "nucleic acid" refer to a polymer composed of a multiplicity of nucleotide units (ribonucleotide or deoxyribonucleotide or related structural variants) linked via phosphodiester bonds, including but not limited to, DNA or RNA. The term encompasses sequences that include any of the known base analogs of DNA and RNA, including, but not limited to, 4 acetylcytosine, 8-hydroxy-N⁶-methyladenosine, aziridinylcytosine, pseudoisocytosine, 5 (carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5 bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl 2 thiouracil, 5 carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N⁶ isopentenyladenine, 1 methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1 methylguanine, 1 methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2 methyladenine, 2 methylguanine, 3-methylcytosine, 5 methylcytosine, N⁶ methyladenine, 7 methylguanine, 5 methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl 2 thiouracil, beta D mannosylqueosine, 5' methoxycarbonylmethyluracil, 5 methoxyuracil, 2 methylthio N⁶ isopentenyladenine, uracil 5 oxyacetic acid methylester, uracil 5 oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2 thiocytosine, 5-methyl-2 thiouracil, 2-thiouracil, 4 thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil 5 oxyacetic acid methylester, uracil 5 oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6 diaminopurine.

[067] The phrase "stringent hybridization conditions" refers to conditions under which a probe will hybridize to its target subsequence, typically in a complex mixture of nucleic acids, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generally, stringent conditions are selected to be about 5-10°C lower than the

33

thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength, pH, and nucleic concentration) at which 50% of the probes complementary to the target hybridize to the target sequence at equilibrium (as the target sequences are present in excess, at T_m , 50% of the probes are occupied at equilibrium). Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. For selective or specific hybridization, a positive signal is at least two times background, preferably 10 times background hybridization. Exemplary stringent hybridization conditions can be as following: 50% formamide, 5×SSC, and 1% SDS, incubating at 42°C., or, 5×SSC, 1% SDS, incubating at 65°C, with wash in 0.2×SSC, and 0.1% SDS at 65°C.

[068] The term "gene" refers to a nucleic acid (e.g., DNA) sequence that comprises coding sequences necessary for the production of a polypeptide, precursor, or RNA (e.g., rRNA, tRNA). The polypeptide can be encoded by a full length coding sequence or by any portion of the coding sequence so long as the desired activity or functional properties (e.g., enzymatic activity, ligand binding, signal transduction, immunogenicity, etc.) of the full-length or fragment are retained. The term also encompasses the coding region of a structural gene and the sequences located adjacent to the coding region on both the 5' and 3' ends for a distance of about 1 kb or more on either end such that the gene corresponds to the length of the full-length mRNA. Sequences located 5' of the coding region and present on the mRNA are referred to as 5' non-translated sequences. Sequences located 3' or downstream of the coding region and present on the mRNA are referred to as 3' non-translated sequences. The term "gene" encompasses both cDNA and genomic forms of a gene. A genomic form or clone of a gene contains the coding region interrupted with non-coding sequences termed "introns" or "intervening regions" or "intervening sequences." Introns are segments of a gene that are transcribed into nuclear RNA (hnRNA); introns can contain regulatory elements such

as enhancers. Introns are removed or "spliced out" from the nuclear or primary transcript; introns therefore are absent in the messenger RNA (mRNA) transcript. The mRNA functions during translation to specify the sequence or order of amino acids in a nascent polypeptide. In addition to containing introns, genomic forms of a gene can also include sequences located on both the 5' and 3' end of the sequences that are present on the RNA transcript. These sequences are referred to as "flanking" sequences or regions (these flanking sequences are located 5' or 3' to the non-translated sequences present on the mRNA transcript). The 5' flanking region can contain regulatory sequences such as promoters and enhancers that control or influence the transcription of the gene. The 3' flanking region can contain sequences that direct the termination of transcription, post transcriptional cleavage and polyadenylation.

[069] The term "recombinant" when used with reference to a cell, nucleic acid, protein or vector indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein, the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, e.g., recombinant cells express genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell or express native genes that are overexpressed or otherwise abnormally expressed such as, for example, expressed as non-naturally occurring fragments or splice variants. By the term "recombinant nucleic acid" herein is meant nucleic acid, originally formed in vitro, in general, by the manipulation of nucleic acid, e.g., using polymerases and endonucleases, in a form not normally found in nature. In this manner, operably linkage of different sequences is achieved. Thus an isolated nucleic acid, in a linear form, or an expression vector formed in vitro by ligating DNA molecules that are not normally joined, are both considered recombinant for the purposes of this invention. It is understood that once a recombinant nucleic acid is made and introduced into a host cell or organism, it will replicate non-

recombinantly, i.e., using the in vivo cellular machinery of the host cell rather than in vitro manipulations; however, such nucleic acids, once produced recombinantly, although subsequently replicated non-recombinantly, are still considered recombinant for the purposes of the invention. Similarly, a "recombinant protein" is a protein made using recombinant techniques, i.e., through the expression of a recombinant nucleic acid as depicted above.

[070] As used herein, the term "heterologous gene" refers to a gene that is not in its natural environment. For example, a heterologous gene includes a gene from one species introduced into another species. A heterologous gene also includes a gene native to an organism that has been altered in some way (e.g., mutated, added in multiple copies, linked to non-native regulatory sequences, etc). Heterologous genes are distinguished from endogenous genes in that the heterologous gene sequences are typically joined to DNA sequences that are not found naturally associated with the gene sequences in the chromosome or are associated with portions of the chromosome not found in nature (e.g., genes expressed in loci where the gene is not normally expressed).

[071] As used herein, the term "vector" is used in reference to nucleic acid molecules that transfer DNA segment(s) from one cell to another. The term "vehicle" is sometimes used interchangeably with "vector." Vectors are often derived from plasmids, bacteriophages, or plant or animal viruses.

[072] "Ligation" refers to the process of forming phosphodiester bonds between two double stranded nucleic acid fragments. Unless otherwise provided, ligation can be accomplished using known buffers and conditions with 10 units to T4 DNA ligase ("ligase") per 0.5 ug of approximately equimolar amounts of the DNA fragments to be ligated. Ligation of nucleic acid can serve to link two proteins together in-frame to produce a single protein, or fusion protein.

26

[073] As used herein, the term "gene expression" refers to the process of converting genetic information encoded in a gene into RNA (e.g., mRNA, rRNA, tRNA, or snRNA) through "transcription" of the gene (e.g., via the enzymatic action of an RNA polymerase), and for protein encoding genes, into protein through "translation" of mRNA. Gene expression can be regulated at many stages in the process. "Up-regulation" or "activation" refers to regulation that increases the production of gene expression products (e.g., RNA or protein), while "down-regulation" or "repression" refers to regulation that decrease production. Molecules (e.g., transcription factors) that are involved in up-regulation or down-regulation are often called "activators" and "repressors," respectively.

[074] The terms "polypeptide," "peptide," "protein," and "protein fragment" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymers.

[075] The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function similarly to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, e.g., hydroxyproline, gamma-carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, e.g., an alpha carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, e.g., homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs can have modified R groups (e.g., norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics

37

refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that functions similarly to a naturally occurring amino acid.

[076] "Conservatively modified variants" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. "Amino acid variants" refers to amino acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical or associated (e.g., naturally contiguous) sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode most proteins. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to another of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes silent variations of the nucleic acid. One of skill will recognize that in certain contexts each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, silent variations of a nucleic acid which encodes a polypeptide is implicit in a described sequence with respect to the expression product, but not with respect to actual probe sequences. As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a "conservatively modified variant" including where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well

known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention. Typically conservative substitutions include: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (see, e.g., Creighton, Proteins (1984)).

[077] The term "epitope tagged" as used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a cancer stem cell marker protein, or a domain sequence or portion thereof, fused to an "epitope tag". The epitope tag polypeptide comprises enough amino acid residues to provide an epitope for recognition by an antibody, yet is short enough such that it does not interfere with the activity of the cancer stem cell marker protein. Suitable epitope tags generally have at least six amino acid residues, usually between about 8 to about 50 amino acid residues, and at times between about 10 to about 20 residues. Commonly used epitope tags include Fc, HA, His, and FLAG tags.

[078] The present invention provides compositions and methods for studying, diagnosing, characterizing, and treating cancer. In particular, the present invention provides antibodies against solid tumor stem cell markers and methods of using these antibodies to inhibit tumor growth and treat cancer in human patients. In certain embodiments, antibodies of the present invention include antagonist antibodies that specifically bind to a cancer stem cell marker protein and interfere with, for example, ligand binding, receptor dimerization, expression of a cancer stem cell marker protein, and/or signaling of a cancer stem cell marker protein. In certain embodiments, disclosed antibodies include agonist antibodies that specifically bind to a cancer stem cell marker protein and promote, for example, ligand binding, receptor dimerization, and/or signaling by a cancer stem cell marker protein. In

34

certain embodiments, disclosed antibodies do not interfere with or promote the biological activity of a cancer stem cell marker protein but inhibit tumor growth by, for example, internalization and/or recognition by the immune system. In certain embodiments, the antibodies specifically recognize more than one solid tumor stem cells marker protein.

[079] Provided is an isolated antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the antibody affects growth of a tumor. In certain embodiments the antibody is a monoclonal antibody. In certain embodiments the antibody is a chimeric antibody. In certain embodiments the antibody is a humanized antibody. In certain embodiments the antibody is a human antibody. Further provided is a pharmaceutical composition comprising an antibody of the present disclosure and a pharmaceutically acceptable vehicle.

[080] Further provided is a method of treating cancer comprising administering an therapeutically effective amount of an antibody or a pharmaceutical composition of the present disclosure. In certain embodiments the antibody is conjugated to a cytotoxic moiety. In certain embodiments the method further comprises administering at least one additional therapeutic agent appropriate for effecting combination therapy. In certain embodiments the tumor cells are chosen from a breast tumor, colorectal tumor, lung tumor, prostate tumor, pancreatic tumor, and a head and neck tumor.

[081] Like the tissues in which they originate, solid tumors consist of a heterogeneous population of cells. That the majority of these cells lack tumorigenicity suggested that the development and maintenance of solid tumors also relies on a small population of stem cells (i.e., tumorigenic cancer cells) with the capacity to proliferate and efficiently give rise both to additional tumor stem cells (self-renewal) and to the majority of more differentiated tumor cells that lack tumorigenic potential (i.e., non-tumorigenic cancer

cells). The concept of cancer stem cells was first introduced soon after the discovery of hematopoietic stem cells (HSC) and was established experimentally in acute myelogenous leukemia (AML) (Park et al., 1971, *J. Natl. Cancer Inst.* 46:411-22; Lapidot et al., 1994, *Nature* 367:645-8; Bonnet & Dick, 1997, *Nat. Med.* 3:730-7; Hope et al., 2004, *Nat. Immunol.* 5:738-43). Stem cells from solid tumors have more recently been isolated based on their expression of a unique pattern of cell-surface receptors and on the assessment of their properties of self-renewal and proliferation in culture and in xenograft animal models. An ESA+ CD44+ CD24-/low Lineage- population greater than 50-fold enriched for the ability to form tumors relative to unfractionated tumor cells was discovered (Al-Hajj et al., 2003, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 100:3983-8). The ability to isolate tumorigenic cancer stem cells from the bulk of non-tumorigenic tumor cells has led to the identification of cancer stem cell markers, genes with differential expression in cancer stem cells compared to non-tumorigenic tumor cells or normal breast epithelium, using microarray analysis. The present invention employs the knowledge of these identified cancer stem cell markers to diagnosis and treat cancer.

[082] The cancer stem cell markers of the present invention relate to human DLL4, a Notch receptor ligand. The Notch signaling pathway is one of several critical regulators of embryonic pattern formation, post-embryonic tissue maintenance, and stem cell biology. More specifically, Notch signaling is involved in the process of lateral inhibition between adjacent cell fates and plays an important role in cell fate determination during asymmetric cell divisions. Unregulated Notch signaling is associated with numerous human cancers where it can alter the developmental fate of tumor cells to maintain them in an undifferentiated and proliferative state (Brennan and Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69). Thus carcinogenesis can proceed by usurping homeostatic mechanisms controlling normal development and tissue repair by stem cell populations (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324).

u1

[083] The Notch receptor was first identified in *Drosophila* mutants.

Haploinsufficiency of *Drosophila Notch* results in notches at the wing margin whereas loss-of-function produces an embryonic lethal "neurogenic" phenotype where cells of the epidermis switch fate to neural tissue (Moohr, 1919, *Genet.* 4:252; Poulson, 1937, *PNAS* 23:133; Poulson, 1940, *J. Exp. Zool.* 83:271). The Notch receptor is a single-pass transmembrane receptor containing numerous tandem epidermal growth factor (EGF)-like repeats and cysteine-rich Notch/LIN-12 repeats within a large extracellular domain (Wharton et al., 1985, *Cell* 43:567; Kidd et al., 1986, *Mol. Cell Biol.* 6:3094; reviewed in Artavanis et al., 1999, *Science* 284:770). Four mammalian Notch proteins have been identified (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, and NOTCH4), and mutations in these receptors invariably result in developmental abnormalities and human pathologies including several cancers as described in detail below (Gridley, 1997, *Mol. Cell Neurosci.* 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:619-25).

[084] The Notch receptor is activated by single-pass transmembrane ligands of the Delta, Serrate, Lag-2 (DSL) family. The known Notch ligands in mammals, Delta-like 1 (Dll1), Delta-like 3 (Dll3), Delta-like 4 (Dll4), Jagged 1 and Jagged 2, are characterized by a DSL domain and tandem EGF-like repeats within the extracellular domain. The extracellular domain of the Notch receptor interacts with that of its ligands, typically on adjacent cells, resulting in two proteolytic cleavages of Notch, an extracellular cleavage mediated by an ADAM protease and a cleavage within the transmembrane domain mediated by gamma secretase. This latter cleavage generates the Notch intracellular domain (NICD). The NICD then enters the nucleus where it activates the CBF1, Suppressor of Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL) family of transcription factors as the major downstream effectors to increase transcription of nuclear basic helix-loop-helix transcription factors of the Hairy and Enhancer of Split [E(spl)] family (Artavanis et al., 1999, *Science* 284:770; Brennan and Brown, 2003,

42

Breast Cancer Res. 5:69; Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543).

Alternative intracellular pathways involving the cytoplasmic protein Deltex identified in *Drosophila* may also exist in mammals (Martinez et al., 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:524-33), and this Deltex-dependent pathway may act to suppress expression of Wnt target genes (Brennan et al., 1999, *Curr. Biol.* 9:707-710; Lawrence et al., 2001, *Curr. Biol.* 11:375-85).

[085] Hematopoietic stem cells (HSCs) are the best understood stem cells in the body, and Notch signaling is implicated both in their normal maintenance as well as in leukemic transformation (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73). HSCs are a rare population of cells that reside in a stromal niche within the adult bone marrow. These cells are characterized both by a unique gene expression profile as well as an ability to continuously give rise to more differentiated progenitor cells to reconstitute the entire hematopoietic system. Constitutive activation of Notch1 signaling in HSCs and progenitor cells establishes immortalized cell lines that generate both lymphoid and myeloid cells in vitro and in long-term reconstitution assays (Varnum-Finney et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), and the presence of Jagged 1 increases engraftment of human bone marrow cell populations enriched for HSCs (Karanu et al., 2000, *J. Exp. Med.* 192:1365-72). More recently, Notch signaling has been demonstrated in HSCs in vivo and shown to be involved in inhibiting HSC differentiation. Furthermore, Notch signaling appears to be required for Wnt-mediated HSC self-renewal (Duncan et al., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).

[086] The Notch signaling pathway also plays a central role in the maintenance of neural stem cells and is implicated both in their normal maintenance as well as in brain cancers (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73; Purow et al., 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800). Neural stem cells give rise to all neuronal and glial cells in the mammalian nervous system during development, and

more recently have been identified in the adult brain (Gage, 2000, *Science* 287:1433-8).

Mice deficient for Notch1; the Notch target genes Hes1, 3, and 5; and a regulator of Notch signaling presenilin1 (PS1) show decreased numbers of embryonic neural stem cells.

Furthermore, adult neural stem cells are reduced in the brains of PS1 heterozygote mice (Nakamura et al., 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, *Genes Dev.* 16:846-58).

The reduction in neural stem cells appears to result from their premature differentiation into neurons (Hatakeyama et al., 2004, *Dev.* 131:5539-50) suggesting that Notch signaling regulates neural stem cell differentiation and self-renewal.

[087] Aberrant Notch signaling is implicated in a number of human cancers. The NOTCH1 gene in humans was first identified in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias as a translocated locus resulting in activation of the Notch pathway (Ellisen et al., 1991, *Cell* 66:649-61). Constitutive activation of Notch1 signaling in T-cells in mouse models similarly generates T-cell lymphomas suggesting a causative role (Robey et al., 1996, *Cell* 87:483-92; Pear et al., 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan et al., 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, *EMBO J.* 19:3337-48). Recently NOTCH1 point mutations, insertions, and deletions producing aberrant NOTCH1 signaling have been found to be frequently present in both childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).

[088] The frequent insertion of the mouse mammary tumor virus into both the Notch1 and Notch4 locus in mammary tumors and the resulting activated Notch protein fragments first implicated Notch signaling in breast cancer (Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Further studies in transgenic mice have confirmed a role for Notch in ductal branching during normal mammary gland development, and a constitutively active form of Notch4 in mammary epithelial cells inhibits epithelial differentiation and results in

tumorigenesis (Jhappan et al., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan et al., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith et al., 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano et al., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Currently the evidence for a role for Notch in human breast cancer is limited to the expression of Notch receptors in breast carcinomas and their correlation with clinical outcome (Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Furthermore, overexpression of the Notch pathway has been observed in cervical cancers (Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8), renal cell carcinomas (Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32), head and neck squamous cell carcinomas (Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4), endometrial cancers (Suzuki et al., 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9), and neuroblastomas (van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8) indicative of a potential role for Notch in the development of a number of neoplasms. Interestingly, Notch signaling might play a role in the maintenance of the undifferentiated state of Apc-mutant neoplastic cells of the colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends Mol. Med.* 11:496-502).

[089] The Notch pathway is also involved in multiple aspects of vascular development including proliferation, migration, smooth muscle differentiation, angiogenesis and arterial-venous differentiation (Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). For example, homozygous null mutations in Notch-1/4 and Jagged-1 as well as heterozygous loss of Dll4 result in severe though variable defects in arterial development and yolk sac vascularization. Furthermore, Dll1-deficient and Notch-2-hypomorphic mice embryos show hemorrhage that likely results from poor development of vascular structures (Gale et al., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue et al., 1999, *Hum. Mol. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright et al., 2001, *Dev.* 128:491-502). In humans, mutations in JAGGED1 are associated

US

with Alagille syndrome, a developmental disorder that includes vascular defects, and mutations in NOTCH3 are responsible for an inherited vascular dementia (CADASIL) in which vessel homeostasis is defective (Joutel et al., 1996, Nature 383:707-10).

[090] The identification of DLL4 as expressed in cancer stem cells compared to normal breast epithelium suggested targeting the Notch pathway to eliminate not only the majority of non-tumorigenic cancer cells, but also the tumorigenic cells responsible for the formation and reoccurrence of solid tumors. Furthermore, because of the prominent role of angiogenesis in tumor formation and maintenance, targeting the Notch pathway via antibodies against DLL4 can also effectively inhibit angiogenesis, starving a cancer of nutrients and contributing to its elimination.

[091] Thus, present invention provides a cancer stem cell marker, the expression of which can be analyzed to diagnosis or monitor a disease associated with cancer. In some embodiments, expression of a cancer stem cell marker is determined by polynucleotide expression such as, for example, mRNA encoding the cancer stem cell marker. The polynucleotide can be detected and quantified by any of a number of means well known to those of skill in the art. In some embodiments, mRNA encoding a cancer stem cell marker is detected by in situ hybridization of tissue sections from, for example, a patient biopsy. In some embodiments, RNA is isolated from a tissue and detected by, for example, Northern blot, quantitative RT-PCR, or microarrays. For example, total RNA can be extracted from a tissue sample and primers that specifically hybridize and amplify a cancer stem cell marker can be used to detect expression of a cancer stem cell marker polynucleotide using RT-PCR.

[092] In certain embodiments, expression of a cancer stem cell marker can be determined by detection of the corresponding polypeptide. The polypeptide can be detected and quantified by any of a number of means well known to those of skill in the art. In some embodiments, a cancer stem cell marker polypeptide is detected using analytic biochemical

methods such as, for example, electrophoresis, capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC) or thin layer chromatography (TLC). The isolated polypeptide can also be sequenced according to standard techniques. In some embodiments, a cancer stem cell marker protein is detected with antibodies raised against the protein using, for example, immunofluorescence or immunohistochemistry on tissue sections. Alternatively antibodies against a cancer stem cell marker can detect expression using, for example, ELISA, FACS, Western blot, immunoprecipitation or protein microarrays. For example, cancer stem cells can be isolated from a patient biopsy and expression of a cancer stem cell marker protein detected with fluorescently labeled antibodies using FACS. In another method, the cells expressing a cancer stem cell marker can be detected *in vivo* using labeled antibodies in typical imaging system. For example, antibodies labeled with paramagnetic isotopes can be used for magnetic resonance imaging (MRI).

[093] In some embodiments of the present invention, a diagnostic assay comprises determining the expression or not of a cancer stem cell marker in tumor cells using, for example, immunohistochemistry, in situ hybridization, or RT-PCR. In other embodiments, a diagnostic assay comprises determining expression levels of a cancer stem cell marker using, for example, quantitative RT-PCR. In some embodiments, a diagnostic assay further comprises determining expression levels of a cancer stem cell marker compared to a control tissue such as, for example, normal epithelium.

[094] Detection of a cancer stem cell marker expression can then be used to provide a prognosis and select a therapy. A prognosis can be based on any known risk expression of a cancer stem cell marker indicates. Furthermore, detection of a cancer stem cell marker can be used to select an appropriate therapy including, for example, treatment with antibodies against the detected cancer stem cell marker protein. In certain embodiments,

UP

the antibody specifically binds to the extracellular domain of a cancer stem cell marker protein such as the Notch receptor ligand, DLL4.

[095] In the context of the present invention, a suitable antibody is an agent that can have one or more of the following effects, for example: interfere with the expression of a cancer stem cell marker; interfere with activation of a cancer stem cell signal transduction pathway by, for example, sterically inhibiting interactions between a cancer stem cell marker and its ligand, receptor or co-receptors; activate a cancer stem cell signal transduction pathway by, for example, acting as a ligand or promoting the binding of an endogenous ligand; or bind to a cancer stem cell marker and inhibit tumor cell proliferation.

[096] In certain embodiments, antibodies against a cancer stem cell marker act extracellularly to modulate the function of a cancer stem cell marker protein. In some embodiments, extracellular binding of an antibody against a cancer stem cell marker can inhibit the signaling of a cancer stem cell marker protein by, for example, inhibiting intrinsic activation (e.g. kinase activity) of a cancer stem cell marker and/or by sterically inhibiting the interaction, for example, of a cancer stem cell marker with its ligand, with its receptor, with a co-receptor, or with the extracellular matrix. In some embodiments, extracellular binding of an antibody against a cancer stem cell marker can downregulate cell-surface expression of a cancer stem cell marker such as, for example, by internalization of a cancer stem cell marker protein or decreasing cell surface trafficking of a cancer stem cell marker. In some embodiments, extracellular binding of an antibody against a cancer stem cell marker can promote the signaling of a cancer stem cell marker protein by, for example, acting as a decoy ligand or increasing ligand binding.

[097] In certain embodiments, antibodies against a cancer stem cell marker bind to a cancer stem cell marker protein and have one or more of the following effects: inhibit proliferation of tumor cells, trigger cell death of tumor cells, promote differentiation of tumor

cells into a less tumorigenic cell type, or prevent metastasis of tumor cells. In certain embodiments, antibodies against a cancer stem cell marker trigger cell death via a conjugated toxin, chemotherapeutic agent, radioisotope, or other such agent. For example, an antibody against a cancer stem cell marker is conjugated to a toxin that is activated in tumor cells expressing the cancer stem cell marker by protein internalization.

[098] In certain embodiments, antibodies against a cancer stem cell marker mediate cell death of a cell expressing the cancer stem cell marker protein via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). ADCC involves cell lysis by effector cells that recognize the Fc portion of an antibody. Many lymphocytes, monocytes, tissue macrophages, granulocytes and eosinophiles, for example, have Fc receptors and can mediate cytolysis (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497).

[099] In certain embodiments, antibodies against a cancer stem cell marker trigger cell death of a cell expressing a cancer stem cell marker protein by activating complement-dependent cytotoxicity (CDC). CDC involves binding of serum complement to the Fc portion of an antibody and subsequent activation of the complement protein cascade, resulting in cell membrane damage and eventual cell death. Biological activity of antibodies is known to be determined, to a large extent, by the constant domains or Fc region of the antibody molecule (Uananue and Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Antibodies of different classes and subclasses differ in this respect, as do antibodies of the same subclass but from different species. Of human antibodies, IgM is the most efficient class of antibodies to bind complement, followed by IgG1, IgG3, and IgG2 whereas IgG4 appears quite deficient in activating the complement cascade (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497; Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). According to the present invention, antibodies of those classes having the desired biological activity are prepared.

u9

[0100] The ability of any particular antibody against a cancer stem cell to mediate lysis of the target cell by complement activation and/or ADCC can be assayed. The cells of interest are grown and labeled *in vitro*; the antibody is added to the cell culture in combination with either serum complement or immune cells which can be activated by the antigen antibody complexes. Cytolysis of the target cells is detected, for example, by the release of label from the lysed cells. In fact, antibodies can be screened using the patient's own serum as a source of complement and/or immune cells. The antibody that is capable of activating complement or mediating ADCC in the *in vitro* test can then be used therapeutically in that particular patient.

[0101] In certain embodiments, antibodies against a cancer stem cell marker can trigger cell death inhibiting angiogenesis. Angiogenesis is the process by which new blood vessels form from pre-existing vessels and is a fundamental process required for normal growth, for example, during embryonic development, wound healing, and in response to ovulation. Solid tumor growth larger than 1-2 mm² also requires angiogenesis to supply nutrients and oxygen without which tumor cells die. In certain embodiments, an antibody against a cancer stem cell marker targets vascular cells that express the cancer stem cell marker including, for example, endothelial cells, smooth muscle cells, or components of the extracellular matrix required for vascular assembly. In certain embodiments, an antibody against a cancer stem cell marker inhibits growth factor signaling required by vascular cell recruitment, assembly, maintenance, or survival.

[0102] The antibodies against a cancer stem cell marker find use in the diagnostic and therapeutic methods described herein. In certain embodiments, the antibodies of the present invention are used to detect the expression of a cancer stem cell marker protein in biological samples such as, for example, a patient tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample. Tissue biopsies can be sectioned and protein detected using, for example,

SD

immunofluorescence or immunohistochemistry. In addition, individual cells from a sample can be isolated, and protein expression detected on fixed or live cells by FACS analysis. In certain embodiments, antibodies can be used on protein arrays to detect expression of a cancer stem cell marker, for example, on tumor cells, in cell lysates, or in other protein samples. In certain embodiments, the antibodies of the present invention are used to inhibit the growth of tumor cells by contacting the antibodies with tumor cells in *in vitro* cell based assays, *in vivo* animal models, etc. In certain embodiments, the antibodies are used to treat cancer in a patient by administering a therapeutically effective amount of an antibody against a cancer stem cell marker.

[0103] The antibodies of the invention can be prepared by any conventional means known in the art. For example, polyclonal antibodies can be prepared by immunizing an animal (e.g. a rabbit, rat, mouse, donkey, etc) by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of the relevant antigen (a purified peptide fragment, full-length recombinant protein, fusion protein, etc) optionally conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, etc. diluted in sterile saline and combined with an adjuvant (e.g. Complete or Incomplete Freund's Adjuvant) to form a stable emulsion. The polyclonal antibody is then recovered from blood, ascites and the like, of an animal so immunized. Collected blood is clotted, and the serum decanted, clarified by centrifugation, and assayed for antibody titer. The polyclonal antibodies can be purified from serum or ascites according to standard methods in the art including affinity chromatography, ion-exchange chromatography, gel electrophoresis, dialysis, etc.

[0104] Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495. Using the hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is immunized as described above to elicit the production by lymphocytes of antibodies that will specifically bind to an

51

immunizing antigen. Lymphocytes can also be immunized *in vitro*. Following immunization, the lymphocytes are isolated and fused with a suitable myeloma cell line using, for example, polyethylene glycol, to form hybridoma cells that can then be selected away from unfused lymphocytes and myeloma cells. Hybridomas that produce monoclonal antibodies directed specifically against a chosen antigen as determined by immunoprecipitation, immunoblotting, or by an *in vitro* binding assay (e.g. radioimmunoassay (RIA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) can then be propagated either *in vitro* culture using standard methods (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) or *in vivo* as ascites tumors in an animal. The monoclonal antibodies can then be purified from the culture medium or ascites fluid as described for polyclonal antibodies above.

[0105] Alternatively monoclonal antibodies can also be made using recombinant DNA methods as described in U.S. Patent 4,816,567. The polynucleotides encoding a monoclonal antibody are isolated from mature B-cells or hybridoma cell, such as by RT-PCR using oligonucleotide primers that specifically amplify the genes encoding the heavy and light chains of the antibody, and their sequence is determined using conventional procedures. The isolated polynucleotides encoding the heavy and light chains are then cloned into suitable expression vectors, which when transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, monoclonal antibodies are generated by the host cells. Also, recombinant monoclonal antibodies or fragments thereof of the desired species can be isolated from phage display libraries expressing CDRs of the desired species as described (McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; and Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

[0106] The polynucleotide(s) encoding a monoclonal antibody can further be modified in a number of different manners using recombinant DNA technology to generate

52

alternative antibodies. In some embodiments, the constant domains of the light and heavy chains of, for example, a mouse monoclonal antibody can be substituted 1) for those regions of, for example, a human antibody to generate a chimeric antibody or 2) for a non-immunoglobulin polypeptide to generate a fusion antibody. In some embodiments, the constant regions are truncated or removed to generate the desired antibody fragment of a monoclonal antibody. Site-directed or high-density mutagenesis of the variable region can be used to optimize specificity, affinity, etc. of a monoclonal antibody.

[0107] In some embodiments of the present invention, the monoclonal antibody against a cancer stem cell marker is a humanized antibody. Humanized antibodies are antibodies that contain minimal sequences from non-human (e.g. murine) antibodies within the variable regions. Such antibodies are used therapeutically to reduce antigenicity and HAMA (human anti-mouse antibody) responses when administered to a human subject. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies with minimum to no non-human sequences. A human antibody is an antibody produced by a human or an antibody having an amino acid sequence corresponding to an antibody produced by a human.

[0108] Humanized antibodies can be produced using various techniques known in the art. An antibody can be humanized by substituting the CDRs of a human antibody with that of a non-human antibody (e.g. mouse, rat, rabbit, hamster, etc.) having the desired specificity, affinity, and capability following the methods of (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). The humanized antibody can be further modified by the substitution of additional residue either in the variable human framework region and/or within the replaced non-human residues to refine and optimize antibody specificity, affinity, and/or capability.

[0109] The choice of human heavy and/or light chain variable domains to be used in making humanized antibodies can be important for reducing antigenicity. According to the

“best-fit” method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain amino acid sequences. Thus in certain embodiments, the human amino acid sequence which is most homologous to that of the rodent antibody from which the CDRs are taken is used as the human framework region (FR) for the humanized antibody (Sims et al., 1993, *J. Immunol.*, 151: 2296; Chothia et al., 1987, *J. Mol. Biol.*, 196: 901). Another method uses a particular FR derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains and can be used for several different humanized antibodies (Carter et al., 1992, *PNAS*, 89: 4285; Presta et al., 1993, *J. Immunol.*, 151: 2623). In certain embodiments, a combination of methods is used to pick the human variable FR to use in generation of humanized antibodies.

[0110] It is further understood that antibodies (e.g. rodent) to be humanized must retain high affinity for the antigen as well as other favorable biological properties. To achieve this goal, humanized antibodies can be prepared by a process of analysis of the parental sequence from the rodent antibody to be humanized and the various candidate humanizing sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are available and familiar to those skilled in the art. Computer programs can be used to illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate antibody sequences. Use of such models permits analysis of the likely role of the residues in the function of the antibody to be humanized, i.e., the analysis of residues that influence the ability of the candidate antibody to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the parental antibody to the recipient humanized antibody so that the desired antibody characteristics are achieved. In general, the residues in the CDRs of the antigen determination region (or hypervariable region) are retained from the parental antibody (e.g. the rodent antibody with the desired antigen binding properties) in the humanized antibody for antigen binding. In certain embodiments, at least one additional

residue within the variable FR is retained from the parental antibody in the humanized antibody. In certain embodiments, up to six additional residues within the variable FR are retained from the parental antibody in the humanized antibody.

[0111] Amino acids from the variable regions of the mature heavy and light chains of immunoglobulins are designated Hx and Lx respectively, where x is a number designating the position of an amino acid according to the scheme of Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1987, 1991. Kabat lists many amino acid sequences for antibodies for each subgroup, and lists the most commonly occurring amino acid for each residue position in that subgroup to generate a consensus sequence. Kabat uses a method for assigning a residue number to each amino acid in a listed sequence, and this method for assigning residue numbers has become standard in the field. Kabat's scheme is extendible to other antibodies not included in his compendium by aligning the antibody in question with one of the consensus sequences in Kabat by reference to conserved amino acids. The use of the Kabat numbering system readily identifies amino acids at equivalent positions in different antibodies. For example, an amino acid at the L50 position of a human antibody occupies the equivalent position to an amino acid position L50 of a mouse antibody. Moreover, any two antibody sequences can be uniquely aligned, for example to determine percent identity, by using the Kabat numbering system so that each amino acid in one antibody sequence is aligned with the amino acid in the other sequence that has the same Kabat number. After alignment, if a subject antibody region (e.g., the entire mature variable region of a heavy or light chain) is being compared with the same region of a reference antibody, the percentage sequence identity between the subject and reference antibody regions is the number of positions occupied by the same amino acid in both the subject and reference antibody region divided by the total number of aligned

55

positions of the two regions, with gaps not counted, multiplied by 100 to convert to percentage.

[0112] Example 1 below describes the production of exemplary humanized anti-DLL4 antibodies which specifically bind human DLL4, a cancer stem cell marker of the present disclosure (21M18 H9L2, ATCC deposit no. PTA-8427 and 21M18 H7L2, ATCC deposit no. PTA-8425, deposited May 10, 2007; (American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)). In certain embodiments, the humanized antibodies comprise nonhuman antigen determination regions derived from murine monoclonal antibody 21M18. Specifically, in certain embodiments, one or more of the heavy chain CDRs from the parental rodent antibody, CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; or SEQ ID NO: 4, which vary at Kabat position 52a), and CDR3 (SEQ ID NO: 5) are retained in the humanized 21M18 antibody. In certain embodiments, one or more of the light chain CDRs from the parental rodent antibody, CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10), and CDR3 (SEQ ID NO: 11), are retained in the humanized 21M18 antibody. In certain embodiments, the humanized antibodies further comprise at least one FR substitution within either the heavy or light chain human variable region.

[0113] In certain embodiments, the present invention provides a humanized antibody which specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the antibody affects growth of a tumor. In certain embodiments, the humanized antibody is an intact IgG antibody. In certain embodiments, the humanized antibody is an intact IgG₂ antibody. In certain embodiments, the humanized antibody is an antibody fragment. In certain embodiments, the humanized antibody is a Fab fragment.

56

[0114] In certain embodiments, the humanized antibody of the present invention comprises a heavy chain variable (V_H) region comprising a nonhuman antigen determination region and a human variable framework region. In certain embodiments, the nonhuman antigen determination region comprises complementarity determination regions (CDRs) of rodent origin. In certain embodiments, the nonhuman antigen determination region comprises CDRs from a mouse antibody. In certain embodiments, the rodent CDRs derive from monoclonal antibody 21M18, wherein 21M18 comprises a heavy chain variable region designated SEQ ID NO: 6. In certain embodiments, wherein the humanized antibody comprises a V_H region comprising an amino acid sequence of (a) CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; or SEQ ID NO: 4), and CDR3 (SEQ ID NO: 5) or (b) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8.

[0115] In certain embodiments, the human heavy chain variable framework region comprises expressed human sequences. In certain embodiments, at least one residue in the human variable framework region is substituted. In certain embodiments, at least one residue in the human heavy chain variable framework region is at a position selected from the group consisting of 16, 20, 27, 28, 38, and 48 based on the Kabat numbering system. In certain embodiments, positions 16, 20, 27, 28, 38, and 48 are substituted based on the Kabat numbering system. In certain embodiments, at least one residue in the human variable framework region is substituted with a residue occupying the corresponding position in an antibody comprising the nonhuman antigen determination region.

[0116] In certain embodiments, the human heavy chain variable framework region comprises IGH(V)1-18. In certain embodiments, at least one residue in the human variable framework region is substituted. In certain embodiments, at least one residue in the human heavy chain variable framework region is at a position selected from the group consisting of 20H, 28H, 38H, 48H, and 69H based on the Kabat numbering system. In certain

ST

embodiments, positions 20H, 28H, 38H, 48H, and 69H are substituted based on the Kabat numbering system. In certain embodiments, at least one residue in the human variable framework region is substituted with a residue occupying the corresponding position in an antibody comprising the nonhuman antigen determination region.

[0117] In certain embodiments, the humanized antibody of the present invention comprises a light chain variable (V_L) region comprising a nonhuman antigen determination region and a human variable framework region. In certain embodiments, the nonhuman antigen determination region comprises CDRs of rodent origin. In certain embodiments, the nonhuman antigen determination region comprises CDRs from a mouse antibody. In certain embodiments, the CDRs derive from monoclonal antibody 21M18, wherein 21M18 comprises a V_L region designated SEQ ID NO: 12. In certain embodiments, the V_L region comprises an amino acid sequence of (a) CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10), and CDR3 (SEQ ID NO: 11) or (b) SEQ ID NO: 12.

[0118] In certain embodiments, the human light chain variable framework region comprises IGK(V)4-1. In certain embodiments, at least one residue in the human light chain variable framework region is substituted. In certain embodiments, at least one residue in the human variable framework region is at a position selected from the group consisting of 22L and 36L based on the Kabat numbering system. In certain embodiments, positions 22L and 36L are substituted based on the Kabat numbering system. In certain embodiments, at least one residue from the human variable framework region is substituted with a residue occupying the corresponding position in an antibody comprising the nonhuman antigen determination region.

[0119] In certain embodiments, the antibody of the present invention is an antibody that competes with the antibody 21M18 for specific binding to human DLL4, wherein the 21M18 antibody comprises: (a) a heavy chain with a variable region designated SEQ ID NO:

6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8 and (b) a light chain with a variable region designated SEQ ID NO: 12. In certain embodiments, the antibody is a humanized antibody or a human antibody.

[0120] In certain embodiments, the humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL domain (SEQ ID NO: 26), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8 and a light chain variable region having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 12. In some embodiments, the heavy chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8 and the light chain variable region has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO: 12. In some embodiments, the heavy chain variable region has at least 99% sequence identity to SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8 and the light chain variable region has at least 99% sequence identity to SEQ ID NO: 12.

[0121] In certain embodiments, the present invention provides an isolated polynucleotide molecule encoding a humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the antibody comprises a V_H region that comprises a nonhuman antigen determination region encoding CDR1 (SEQ ID NO: 1); CDR2 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4); and CDR3 (SEQ ID NO: 5) and a human variable framework region encoding IGH(V)1-18. In certain embodiments, the present invention provides an isolated polynucleotide molecule encoding a humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the polynucleotide molecule is selected from the group consisting of: (a) a

SA

polynucleotide molecule encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8 and (b) a polynucleotide molecule which hybridizes to the complement of the polynucleotide molecule according to (a) under stringent hybridization conditions. In certain embodiments, the present invention provides an isolated polynucleotide molecule encoding a humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the polynucleotide molecule is selected from the group consisting of (a) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, or SEQ ID NO: 15 and (b) a polynucleotide molecule which hybridizes to the complement of the polynucleotide molecule according to (a) under stringent hybridization conditions.

[0122] In certain embodiments, the present invention provides an isolated polynucleotide molecule encoding a humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the antibody comprises a V_L region that comprises a nonhuman antigen determination region encoding CDR1 (SEQ ID NO: 9); CDR2 (SEQ ID NO: 10); and CDR3 (SEQ ID NO: 11) and a human variable framework region comprising IGK(V)4-1. In certain embodiments, the present invention provides an isolated polynucleotide molecule encoding a humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the polynucleotide molecule is selected from the group consisting of: (a) a polynucleotide molecule encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 and (b) a polynucleotide molecule which hybridizes to the complement of the polynucleotide molecule according to (a) under stringent hybridization conditions. In certain embodiments, the present invention provides an isolated polynucleotide molecule encoding a humanized antibody that specifically binds to a human

DLL4 epitope formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DSL (SEQ ID NO: 26), wherein the polynucleotide molecule is selected from the group consisting of (a) SEQ ID NO: 16 and (b) a polynucleotide molecule which hybridizes to the complement of the polynucleotide molecule according to (a) under stringent hybridization conditions.

[0123] In certain embodiments is provided an expression vector comprising an isolated polynucleotide molecule of the present invention. In certain embodiments is provided a host cell comprising an expression vector comprising an isolated polynucleotide molecule of the present invention

[0124] In certain embodiments, the present invention provides a method of treating cancer in a patient comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a humanized antibody of the present disclosure. In certain embodiments, the cancer comprises breast cancer, colorectal cancer, lung cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, or head and neck cancer.

[0125] In certain embodiments, the present invention provides a kit comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises a humanized antibody of the present disclosure, and further comprises a package insert indicating that the composition can be used to treat cancer.

[0126] In addition, fully human antibodies can be directly prepared using various techniques known in the art. Immortalized human B lymphocytes immunized *in vitro* or isolated from an immunized individual that produce an antibody directed against a target antigen can be generated (See, e.g., Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; and U.S. Patent 5,750,373). Also, the human antibody can be selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies (Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314; Sheets

et al., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Human antibodies can also be made in transgenic mice containing human immunoglobulin loci that are capable upon immunization of producing the full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. This approach is described in U.S. Patents 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016.

[0127] This invention also encompasses bispecific antibodies that specifically recognize a cancer stem cell marker. Bispecific antibodies are antibodies that are capable of specifically recognizing and binding at least two different epitopes. The different epitopes can either be within the same molecule (e.g. the same cancer stem cell marker polypeptide) or on different molecules such that both, for example, the antibodies can specifically recognize and bind a cancer stem cell marker as well as, for example, 1) an effector molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor (e.g. CD3) or Fc receptor (e.g. CD64, CD32, or CD16) or 2) a cytotoxic agent as described in detail below. Bispecific antibodies can be intact antibodies or antibody fragments.

[0128] Exemplary bispecific antibodies can bind to two different epitopes, at least one of which originates in a polypeptide of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen. Bispecific antibodies can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Techniques for making bispecific antibodies are common in the art (Millstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science*



229:81; Suresh et al, 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.* 152:5368; and U.S. Patent 5,731,168). Antibodies with more than two valencies are also contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared (Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991))

[0129] In certain embodiments are provided an antibody fragment to, for example, increase tumor penetration. Various techniques are known for the production of antibody fragments: Traditionally, these fragments are derived via proteolytic digestion of intact antibodies (for example Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). In certain embodiments, antibody fragments are produced recombinantly. Fab, Fv, and scFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli* or other host cells, thus allowing the production of large amounts of these fragments. Such antibody fragments can also be isolated from the antibody phage libraries discussed above. The antibody fragment can also be linear antibodies as described in U.S. Patent 5,641,870, for example, and can be monospecific or bispecific. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner.

[0130] According to the present invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to a polypeptide of the invention (see U.S. Pat. No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of Fab expression libraries (Huse, et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for the Notch receptor ligand DLL4, or derivatives, fragments, or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a polypeptide of the invention may be produced by techniques in the art including, but not limited to: (a) an F(ab')₂ fragment produced by pepsin digestion of an



antibody molecule; (b) an Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an F(ab')₂ fragment, (c) an Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent, and (d) Fv fragments.

[0131] It can further be desirable, especially in the case of antibody fragments, to modify an antibody in order to increase its serum half-life. This can be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle (e.g., by DNA or peptide synthesis).

[0132] Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune cells to unwanted cells (U.S. Pat. No. 4,676,980). It is contemplated that the antibodies can be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

[0133] For the purposes of the present invention, it should be appreciated that modified antibodies can comprise any type of variable region that provides for the association of the antibody with the polypeptides of human DLL4. In this regard, the variable region may comprise or be derived from any type of mammal that can be induced to mount a humoral response and generate immunoglobulins against the desired tumor associated antigen. As such, the variable region of the modified antibodies can be, for example, of human, murine, non-human primate (e.g. cynomolgus monkeys, macaques, etc.) or lupine origin. In some embodiments both the variable and constant regions of the modified

64

immunoglobulins are human. In other embodiments the variable regions of compatible antibodies (usually derived from a non-human source) can be engineered or specifically tailored to improve the binding properties or reduce the immunogenicity of the molecule. In this respect, variable regions useful in the present invention can be humanized or otherwise altered through the inclusion of imported amino acid sequences.

[0134] The variable domains in both the heavy and light chains are altered by at least partial replacement of one or more CDRs and, if necessary, by partial framework region replacement and sequence changing. Although the CDRs may be derived from an antibody of the same class or even subclass as the antibody from which the framework regions are derived, it is envisaged that the CDRs will be derived from an antibody of different class and preferably from an antibody from a different species. It may not be necessary to replace all of the CDRs with the complete CDRs from the donor variable region to transfer the antigen binding capacity of one variable domain to another. Rather, it may only be necessary to transfer those residues that are necessary to maintain the activity of the antigen binding site. Given the explanations set forth in U.S. Pat. Nos. 5,585,089, 5,693,761 and 5,693,762, it will be well within the competence of those skilled in the art, either by carrying out routine experimentation or by trial and error testing to obtain a functional antibody with reduced immunogenicity.

[0135] Alterations to the variable region notwithstanding, those skilled in the art will appreciate that the modified antibodies of this invention will comprise antibodies, or immunoreactive fragments thereof, in which at least a fraction of one or more of the constant region domains has been deleted or otherwise altered so as to provide desired biochemical characteristics such as increased tumor localization or reduced serum half-life when compared with an antibody of approximately the same immunogenicity comprising a native or unaltered constant region. In some embodiments, the constant region of the modified

63

antibodies will comprise a human constant region. Modifications to the constant region compatible with this invention comprise additions, deletions or substitutions of one or more amino acids in one or more domains. That is, the modified antibodies disclosed herein may comprise alterations or modifications to one or more of the three heavy chain constant domains (CH1, CH2 or CH3) and/or to the light chain constant domain (CL). In some embodiments of the invention modified constant regions wherein one or more domains are partially or entirely deleted are contemplated. In some embodiments the modified antibodies will comprise domain deleted constructs or variants wherein the entire CH2 domain has been removed (Δ CH2 constructs). In some embodiments the omitted constant region domain will be replaced by a short amino acid spacer (e.g. 10 residues) that provides some of the molecular flexibility typically imparted by the absent constant region.

[0136] Besides their configuration, it is known in the art that the constant region mediates several effector functions. For example, binding of the C1 component of complement to antibodies activates the complement system. Activation of complement is important in the opsonisation and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and can also be involved in autoimmune hypersensitivity. Further, antibodies bind to cells via the Fc region, with a Fc receptor site on the antibody Fc region binding to a Fc receptor (FcR) on a cell. There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including IgG (gamma receptors), IgE (eta receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer and control of immunoglobulin production. Although various

Fc receptors and receptor sites have been studied to a certain extent, there is still much which is unknown about their location, structure and functioning.

[0137] While not limiting the scope of the present invention, it is believed that antibodies comprising constant regions modified as described herein provide for altered effector functions that, in turn, affect the biological profile of the administered antibody. For example, the deletion or inactivation (through point mutations or other means) of a constant region domain may reduce Fc receptor binding of the circulating modified antibody thereby increasing tumor localization. In other cases it may be that constant region modifications, consistent with this invention, moderate complement binding and thus reduce the serum half life and nonspecific association of a conjugated cytotoxin. Yet other modifications of the constant region may be used to eliminate disulfide linkages or oligosaccharide moieties that allow for enhanced localization due to increased antigen specificity or antibody flexibility. Similarly, modifications to the constant region in accordance with this invention may easily be made using well known biochemical or molecular engineering techniques well within the purview of the skilled artisan.

[0138] It will be noted that the modified antibodies may be engineered to fuse the CH3 domain directly to the hinge region of the respective modified antibodies. In other constructs it may be desirable to provide a peptide spacer between the hinge region and the modified CH2 and/or CH3 domains. For example, compatible constructs could be expressed wherein the CH2 domain has been deleted and the remaining CH3 domain (modified or unmodified) is joined to the hinge region with a 5-20 amino acid spacer. Such a spacer may be added, for instance, to ensure that the regulatory elements of the constant domain remain free and accessible or that the hinge region remains flexible. However, it should be noted that amino acid spacers can, in some cases, prove to be immunogenic and elicit an unwanted immune response against the construct. Accordingly, any spacer added to the construct be

67

relatively non-immunogenic or, even omitted altogether if the desired biochemical qualities of the modified antibodies may be maintained.

[0139] Besides the deletion of whole constant region domains, it will be appreciated that the antibodies of the present invention may be provided by the partial deletion or substitution of a few or even a single amino acid. For example, the mutation of a single amino acid in selected areas of the CH2 domain may be enough to substantially reduce Fc binding and thereby increase tumor localization. Similarly, it may be desirable to simply delete that part of one or more constant region domains that control the effector function (e.g. complement CLQ binding) to be modulated. Such partial deletions of the constant regions may improve selected characteristics of the antibody (serum half-life) while leaving other desirable functions associated with the subject constant region domain intact. Moreover, as alluded to above, the constant regions of the disclosed antibodies may be modified through the mutation or substitution of one or more amino acids that enhances the profile of the resulting construct. In this respect it may be possible to disrupt the activity provided by a conserved binding site (e.g. Fc binding) while substantially maintaining the configuration and immunogenic profile of the modified antibody. Certain embodiments can comprise the addition of one or more amino acids to the constant region to enhance desirable characteristics such as effector function or provide for more cytotoxin or carbohydrate attachment. In such embodiments it can be desirable to insert or replicate specific sequences derived from selected constant region domains.

[0140] The present invention further embraces variants and equivalents which are substantially homologous to the chimeric, humanized and human antibodies, or antibody fragments thereof, set forth herein. These can contain, for example, conservative substitution mutations, i.e. the substitution of one or more amino acids by similar amino acids. For example, conservative substitution refers to the substitution of an amino acid with another

68

within the same general class such as, for example, one acidic amino acid with another acidic amino acid, one basic amino acid with another basic amino acid or one neutral amino acid by another neutral amino acid. What is intended by a conservative amino acid substitution is well known in the art.

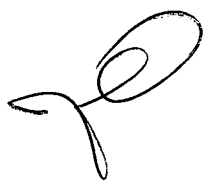
[0141] The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent. Cytotoxic agents include chemotherapeutic agents, growth inhibitory agents, toxins (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), radioactive isotopes (i.e., a radioconjugate), etc. Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates include, for example, methotrexate, adriamycin, doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. In some embodiments, the antibodies can be conjugated to radioisotopes, such as ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re and ^{188}Re using anyone of a number of well known chelators or direct labeling. In other embodiments, the disclosed compositions can comprise antibodies coupled to drugs, prodrugs or lymphokines such as interferon. Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutarelddehyde), bis-azido compounds (such as bis(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium

CA

derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, a trichothene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, can also be used. In some embodiments, the modified antibodies can be complexed with other immunologically active ligands (e.g. antibodies or fragments thereof) wherein the resulting molecule binds to both the neoplastic cell and an effector cell such as a T cell.

[0142] Regardless of how useful quantities are obtained, the antibodies of the present invention can be used in any one of a number of conjugated (i.e. an immunoconjugate) or unconjugated forms. Alternatively, the antibodies of this invention can be used in a nonconjugated or "naked" form to harness the subject's natural defense mechanisms including complement-dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cellular toxicity (ADCC) to eliminate the malignant cells. The selection of which conjugated or unconjugated modified antibody to use will depend of the type and stage of cancer, use of adjunct treatment (e.g., chemotherapy or external radiation) and patient condition. It will be appreciated that one skilled in the art could readily make such a selection in view of the teachings herein.

[0143] The antibodies of the present invention can be assayed for immunospecific binding by any method known in the art. The immunoassays which can be used include, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as BIAcore analysis, FACS analysis, immunofluorescence, immunocytochemistry, Western blots, radioimmunoassays, ELISA, "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays,



and protein A immunoassays. Such assays are routine and well known in the art (see, e.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, which is incorporated by reference herein in its entirety).

[0144] In some embodiments, the immunospecificity of an antibody against a cancer stem cell marker is determined using ELISA. An ELISA assay comprises preparing antigen, coating wells of a 96 well microtiter plate with antigen, adding the antibody against a cancer stem cell marker conjugated to a detectable compound such as an enzymatic substrate (e.g. horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) to the well, incubating for a period of time and detecting the presence of the antigen. In some embodiments, the antibody against a cancer stem cell marker is not conjugated to a detectable compound, but instead a second conjugated antibody that recognizes the antibody against a cancer stem cell marker is added to the well. In some embodiments, instead of coating the well with the antigen, the antibody against a cancer stem cell marker can be coated to the well and a second antibody conjugated to a detectable compound can be added following the addition of the antigen to the coated well. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to increase the signal detected as well as other variations of ELISAs known in the art (see e.g. Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1).

[0145] The binding affinity of an antibody to a cancer stem cell marker antigen and the off-rate of an antibody-antigen interaction can be determined by competitive binding assays. One example of a competitive binding assay is a radioimmunoassay comprising the incubation of labeled antigen (e.g. ^3H or ^{125}I), or fragment or variant thereof, with the antibody of interest in the presence of increasing amounts of unlabeled antigen followed by the detection of the antibody bound to the labeled antigen. The affinity of the antibody against a cancer stem cell marker and the binding off-rates can be determined from the data

by scatchard plot analysis. In some embodiments, BIAcore kinetic analysis is used to determine the binding on and off rates of antibodies against a cancer stem cell marker. BIAcore kinetic analysis comprises analyzing the binding and dissociation of antibodies from chips with immobilized cancer stem cell marker antigens on their surface.

[0146] In certain embodiments, the invention encompasses isolated polynucleotides that encode a polypeptide comprising an antibody, or fragment thereof, against human DLL4. Thus, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" encompasses a polynucleotide which includes only coding sequences for the polypeptide as well as a polynucleotide which includes additional coding and/or non-coding sequences. The polynucleotides of the invention can be in the form of RNA or in the form of DNA. DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA; and can be double-stranded or single-stranded, and if single stranded can be the coding strand or non-coding (anti-sense) strand.

[0147] The present invention further relates to variants of the hereinabove described polynucleotides encoding, for example, fragments, analogs, and derivatives. The variant of the polynucleotide can be a naturally occurring allelic variant of the polynucleotide or a non-naturally occurring variant of the polynucleotide. In certain embodiments, the polynucleotide can have a coding sequence which is a naturally occurring allelic variant of the coding sequence of the disclosed polypeptides. As known in the art, an allelic variant is an alternate form of a polynucleotide sequence that have, for example, a substitution, deletion, or addition of one or more nucleotides, which does not substantially alter the function of the encoded polypeptide.

[0148] In certain embodiments the polynucleotides comprise the coding sequence for the mature polypeptide fused in the same reading frame to a polynucleotide which aids, for example, in expression and secretion of a polypeptide from a host cell (e.g. a leader sequence which functions as a secretory sequence for controlling transport of a polypeptide

from the cell). The polypeptide having a leader sequence is a preprotein and can have the leader sequence cleaved by the host cell to form the mature form of the polypeptide. The polynucleotides can also encode for a proprotein which is the mature protein plus additional 5' amino acid residues. A mature protein having a prosequence is a proprotein and is an inactive form of the protein. Once the prosequence is cleaved an active mature protein remains.

[0149] In certain embodiments the polynucleotides comprise the coding sequence for the mature polypeptide fused in the same reading frame to a marker sequence that allows, for example, for purification of the encoded polypeptide. For example, the marker sequence can be a hexa-histidine tag supplied by a pQE-9 vector to provide for purification of the mature polypeptide fused to the marker in the case of a bacterial host, or the marker sequence can be a hemagglutinin (HA) tag derived from the influenza hemagglutinin protein when a mammalian host (e.g. COS-7 cells) is used.

[0150] In certain embodiments, the present invention provides isolated nucleic acid molecules having a nucleotide sequence at least 80% identical, at least 85% identical, at least 90% identical, at least 95% identical, and in some embodiments, at least 96%, 97%, 98% or 99% identical to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an antibody, or fragment thereof, against human DLL4.

[0151] By a polynucleotide having a nucleotide sequence at least, for example, 95% "identical" to a reference nucleotide sequence is intended that the nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that the polynucleotide sequence can include up to five point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference sequence can be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up



to 5% of the total nucleotides in the reference sequence can be inserted into the reference sequence. These mutations of the reference sequence can occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

[0152] As a practical matter, whether any particular nucleic acid molecule is at least 80% identical, at least 85% identical, at least 90% identical, and in some embodiments, at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to a reference sequence can be determined conventionally using known computer programs such as the Bestfit program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit uses the local homology algorithm of Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), to find the best segment of homology between two sequences. When using Bestfit or any other sequence alignment program to determine whether a particular sequence is, for instance, 95% identical to a reference sequence according to the present invention, the parameters are set such that the percentage of identity is calculated over the full length of the reference nucleotide sequence and that gaps in homology of up to 5% of the total number of nucleotides in the reference sequence are allowed.

[0153] The polynucleotide variants can contain alterations in the coding regions, non-coding regions, or both. In some embodiments the polynucleotide variants contain alterations which produce silent substitutions, additions, or deletions, but do not alter the properties or activities of the encoded polypeptide. In some embodiments, nucleotide variants are produced by silent substitutions due to the degeneracy of the genetic code. Polynucleotide variants can be produced for a variety of reasons, e.g., to optimize codon

expression for a particular host (change codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as *E. coli*).

[0154] The polypeptides of the present invention can be recombinant polypeptides, natural polypeptides, or synthetic polypeptides comprising an antibody, or fragment thereof, against human DLL4. It will be recognized in the art that some amino acid sequences of the invention can be varied without significant effect of the structure or function of the protein. Thus, the invention further includes variations of the polypeptides which show substantial activity or which include regions of an antibody, or fragment thereof, against human DLL4 protein. Such mutants include deletions, insertions, inversions, repeats, and type substitutions.

[0155] The polypeptides and analogs can be further modified to contain additional chemical moieties not normally part of the protein. Those derivatized moieties can improve the solubility, the biological half life or absorption of the protein. The moieties can also reduce or eliminate any desirable side effects of the proteins and the like. An overview for those moieties can be found in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

[0156] The isolated polypeptides described herein can be produced by any suitable method known in the art. Such methods range from direct protein synthetic methods to constructing a DNA sequence encoding isolated polypeptide sequences and expressing those sequences in a suitable transformed host. In some embodiments, a DNA sequence is constructed using recombinant technology by isolating or synthesizing a DNA sequence encoding a wild-type protein of interest. Optionally, the sequence can be mutagenized by site-specific mutagenesis to provide functional analogs thereof. *See, e.g. Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) and U.S. Pat. No. 4,588,585.*



[0157] In some embodiments a DNA sequence encoding a polypeptide of interest would be constructed by chemical synthesis using an oligonucleotide synthesizer. Such oligonucleotides can be designed based on the amino acid sequence of the desired polypeptide and selecting those codons that are favored in the host cell in which the recombinant polypeptide of interest will be produced. Standard methods can be applied to synthesize an isolated polynucleotide sequence encoding an isolated polypeptide of interest. For example, a complete amino acid sequence can be used to construct a back-translated gene. Further, a DNA oligomer containing a nucleotide sequence coding for the particular isolated polypeptide can be synthesized. For example, several small oligonucleotides coding for portions of the desired polypeptide can be synthesized and then ligated. The individual oligonucleotides typically contain 5' or 3' overhangs for complementary assembly.

[0158] Once assembled (by synthesis, site-directed mutagenesis or another method), the polynucleotide sequences encoding a particular isolated polypeptide of interest will be inserted into an expression vector and operatively linked to an expression control sequence appropriate for expression of the protein in a desired host. Proper assembly can be confirmed by nucleotide sequencing, restriction mapping, and expression of a biologically active polypeptide in a suitable host. As is well known in the art, in order to obtain high expression levels of a transfected gene in a host, the gene must be operatively linked to transcriptional and translational expression control sequences that are functional in the chosen expression host.

[0159] Recombinant expression vectors are used to amplify and express DNA encoding cancer stem cell marker polypeptide fusions. Recombinant expression vectors are replicable DNA constructs which have synthetic or cDNA-derived DNA fragments encoding a cancer stem cell marker polypeptide fusion or a bioequivalent analog operatively linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements derived from mammalian,



microbial, viral or insect genes. A transcriptional unit generally comprises an assembly of (1) a genetic element or elements having a regulatory role in gene expression, for example, transcriptional promoters or enhancers, (2) a structural or coding sequence which is transcribed into mRNA and translated into protein, and (3) appropriate transcription and translation initiation and termination sequences, as described in detail below. Such regulatory elements can include an operator sequence to control transcription. The ability to replicate in a host, usually conferred by an origin of replication, and a selection gene to facilitate recognition of transformants can additionally be incorporated. DNA regions are operatively linked when they are functionally related to each other. For example, DNA for a signal peptide (secretory leader) is operatively linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a precursor which participates in the secretion of the polypeptide; a promoter is operatively linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operatively linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. Generally, operatively linked means contiguous and, in the case of secretory leaders, means contiguous and in reading frame. Structural elements intended for use in yeast expression systems include a leader sequence enabling extracellular secretion of translated protein by a host cell. Alternatively, where recombinant protein is expressed without a leader or transport sequence, it can include an N-terminal methionine residue. This residue can optionally be subsequently cleaved from the expressed recombinant protein to provide a final product.

[0160] The choice of expression control sequence and expression vector will depend upon the choice of host. A wide variety of expression host/vector combinations can be employed. Useful expression vectors for eukaryotic hosts, include, for example, vectors comprising expression control sequences from SV40, bovine papilloma virus, adenovims and cytomegalovirus. Useful expression vectors for bacterial hosts include known bacterial



plasmids, such as plasmids from *Escherichia coli*, including pCR 1, pBR322, pMB9 and their derivatives, wider host range plasmids, such as M13 and filamentous single-stranded DNA phages.

[0161] Suitable host cells for expression of a cancer stem cell marker protein include prokaryotes, yeast, insect or higher eukaryotic cells under the control of appropriate promoters. Prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example *E. coli* or bacilli. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described below. Cell-free translation systems could also be employed. Appropriate cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described by Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985), the relevant disclosure of which is hereby incorporated by reference.

[0162] Various mammalian or insect cell culture systems are also advantageously employed to express recombinant protein. Expression of recombinant proteins in mammalian cells can be performed because such proteins are generally correctly folded, appropriately modified and completely functional. Examples of suitable mammalian host cell lines include the COS-7 lines of monkey kidney cells, described by Gluzman (*Cell* 23:175, 1981), and other cell lines capable of expressing an appropriate vector including, for example, L cells, C127, 3T3, Chinese hamster ovary (CHO), HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors can comprise nontranscribed elements such as an origin of replication, a suitable promoter and enhancer linked to the gene to be expressed, and other 5' or 3' flanking nontranscribed sequences, and 5' or 3' nontranslated sequences, such as necessary ribosome binding sites, a polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, and transcriptional termination sequences. Baculovirus systems for production of heterologous proteins in insect cells are reviewed by Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988).

[0163] The proteins produced by a transformed host can be purified according to any suitable method. Such standard methods include chromatography (e.g., ion exchange, affinity and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for protein purification. Affinity tags such as hexahistidine, maltose binding domain, influenza coat sequence and glutathione-S-transferase can be attached to the protein to allow easy purification by passage over an appropriate affinity column. Isolated proteins can also be physically characterized using such techniques as proteolysis, nuclear magnetic resonance and x-ray crystallography.

[0164] For example, supernatants from systems which secrete recombinant protein into culture media can be first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Following the concentration step, the concentrate can be applied to a suitable purification matrix. Alternatively, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. Finally, one or more reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify a cancer stem cell protein-Fc composition. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a homogeneous recombinant protein.

[0165] Recombinant protein produced in bacterial culture can be isolated, for example, by initial extraction from cell pellets, followed by one or more concentration, salting-out, aqueous ion exchange or size exclusion chromatography steps. High performance



liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps. Microbial cells employed in expression of a recombinant protein can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

[0166] The present invention provides methods for inhibiting the growth of tumorigenic cells expressing a cancer stem cell marker using the antibodies against a cancer stem cell marker described herein. In certain embodiments, the method of inhibiting the growth of tumorigenic cells expressing a cancer stem cell marker comprises contacting the cell with an antibody against a cancer stem cell marker *in vitro*. For example, an immortalized cell line or a cancer cell line that expresses a cancer stem cell marker is cultured in medium to which is added an antibody against the expressed cancer stem cell marker to inhibit cell growth. In some embodiments, tumor cells comprising tumor stem cells are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and cultured in medium to which is added an antibody against a cancer stem cell marker to inhibit cell growth.

[0167] In some embodiments, the method of inhibiting the growth of tumorigenic cells expressing a cancer stem cell marker comprises contacting the cell with an antibody against a cancer stem cell marker *in vivo*. In certain embodiments, contacting a tumorigenic cell with an antibody against a cancer stem cell marker is undertaken in an animal model. For example, xenografts expressing a cancer stem cell marker are grown in immunocompromised mice (e.g. NOD/SCID mice) that are administered an antibody against a cancer stem cell marker to inhibit tumor growth. In some embodiments, cancer stem cells that express a cancer stem cell marker are isolated from a patient sample such as, for example, a tissue biopsy, pleural effusion, or blood sample and injected into immunocompromised mice that are then administered an antibody against the cancer stem cell marker to inhibit tumor cell growth. In some embodiments, the antibody against a cancer



stem cell marker is administered at the same time or shortly after introduction of tumorigenic cells into the animal to prevent tumor growth. In some embodiments, the antibody against a cancer stem cell marker is administered as a therapeutic after the tumorigenic cells have grown to a specified size.

[0168] The present invention further provides pharmaceutical compositions comprising antibodies that target a cancer stem cell marker. These pharmaceutical compositions find use in inhibiting tumor cell growth and treating cancer in human patients.

[0169] Formulations are prepared for storage and use by combining a purified antibody of the present invention with a pharmaceutically acceptable vehicle (e.g. carrier, excipient) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Suitable pharmaceutically acceptable vehicles include, but are not limited to, nontoxic buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (e.g. octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride; benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight polypeptides (e.g. less than about 10 amino acid residues); proteins such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; carbohydrates such as monosaccharides, disaccharides, glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and non-ionic surfactants such as TWEEN or polyethylene glycol (PEG).

[0170] The pharmaceutical composition of the present invention can be administered in any number of ways for either local or systemic treatment. Administration

861

can be topical (such as to mucous membranes including vaginal and rectal delivery) such as transdermal patches, ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids and powders; pulmonary (e.g., by inhalation or insufflation of powders or aerosols, including by nebulizer; intratracheal, intranasal, epidermal and transdermal); oral; or parenteral including intravenous, intraarterial, subcutaneous, intraperitoneal or intramuscular injection or infusion; or intracranial (e.g., intrathecal or intraventricular) administration.

[0171] The therapeutic formulation can be in unit dosage form. Such formulations include tablets, pills, capsules, powders, granules, solutions or suspensions in water or non-aqueous media, or suppositories for oral, parenteral, or rectal administration or for administration by inhalation. In solid compositions such as tablets the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical carrier. Conventional tableting ingredients include corn starch, lactose, sucrose, sorbitol, talc, stearic acid, magnesium stearate, dicalcium phosphate or gums, and other diluents (e.g. water) to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention, or a non-toxic pharmaceutically acceptable salt thereof. The solid preformulation composition is then subdivided into unit dosage forms of the type described above. The tablets, pills, etc of the novel composition can be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner composition covered by an outer component. Furthermore, the two components can be separated by an enteric layer that serves to resist disintegration and permits the inner component to pass intact through the stomach or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials including a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol and cellulose acetate.

[0172] Pharmaceutical formulations include antibodies of the present invention complexed with liposomes (Epstein, et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang, et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; and U.S. Patent 4,485,045 and 4,544,545). Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent 5,013,556. Some liposomes can be generated by the reverse phase evaporation with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

[0173] The antibodies can also be entrapped in microcapsules. Such microcapsules are prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions as described in Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing (2000).

[0174] In addition sustained-release preparations can be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles (e.g. films, or microcapsules). Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels such as poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) or poly(vinylalcohol), polylactides (U.S. Patent 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and 7-ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.



[0175] In some embodiments, the treatment involves the combined administration of an antibody of the present invention and a chemotherapeutic agent or cocktail of multiple different chemotherapeutic agents. Treatment with an antibody can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of chemotherapies. Chemotherapies contemplated by the invention include chemical substances or drugs which are known in the art and are commercially available, such as Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Cytosine arabinoside ("Ara-C"), Cyclophosphamide, Thiotepa, Busulfan, Cytosine, Taxol, Methotrexate, Cisplatin, Melphalan, Vinblastine and Carboplatin. Combined administration can include co-administration, either in a single pharmaceutical formulation or using separate formulations, or consecutive administration in either order but generally within a time period such that all active agents can exert their biological activities simultaneously. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents can be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

[0176] In certain embodiments of the invention, the treatment involves the combined administration of an antibody of the present invention and a second therapeutic agent. As used herein, "a second therapeutic agent" includes, but is not limited to, chemotherapeutic agent, radiation therapy, cytokine and antibody against other tumor associated antigen.

[0177] In other embodiments, the treatment involves the combined administration of an antibody of the present invention and radiation therapy. Treatment with the antibody can occur prior to, concurrently with, or subsequent to administration of radiation therapy. Any dosing schedules for such radiation therapy can be used as determined by the skilled practitioner.

[0178] In other embodiments, the treatment can involve the combined administration of antibodies of the present invention with other antibodies against additional tumor associated antigens including, but not limited to, antibodies that bind to the EGF receptor (EGFR) (Erbix®), the erbB2 receptor (HER2) (Herceptin®), and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Avastin®). Furthermore, treatment can include administration of one or more cytokines, can be accompanied by surgical removal of cancer cells or any other therapy deemed necessary by a treating physician.

[0179] For the treatment of the disease, the appropriate dosage of an antibody of the present invention depends on the type of disease to be treated, the severity and course of the disease, the responsiveness of the disease, whether the antibody is administered for therapeutic or preventative purposes, previous therapy, patient's clinical history, and so on all at the discretion of the treating physician. The antibody can be administered one time or over a series of treatments lasting from several days to several months, or until a cure is effected or a diminution of the disease state is achieved (e.g. reduction in tumor size). Optimal dosing schedules can be calculated from measurements of drug accumulation in the body of the patient and will vary depending on the relative potency of an individual antibody. The administering physician can easily determine optimum dosages, dosing methodologies and repetition rates. In general, dosage is from 0.01 µg to 100 mg per kg of body weight, and can be given once or more daily, weekly, monthly or yearly. The treating physician can estimate repetition rates for dosing based on measured residence times and concentrations of the drug in bodily fluids or tissues.

[0180] The present invention provides kits comprising the antibodies described herein and that can be used to perform the methods described herein. In certain embodiments, a kit comprises at least one purified antibody against a cancer stem cell marker in one or more containers. In some embodiments, the kits contain all of the components



necessary and/or sufficient to perform a detection assay, including all controls, directions for performing assays, and any necessary software for analysis and presentation of results. One skilled in the art will readily recognize that the disclosed antibodies of the present invention can be readily incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

[0181] Embodiments of the present disclosure can be further defined by reference to the following examples, which describe in detail preparation of antibodies of the present disclosure and methods for using antibodies of the present disclosure. It will be apparent to those skilled in the art that many modifications, both to materials and methods, may be practiced without departing from the scope of the present disclosure. Wherever possible, the same reference numbers will be used throughout the drawings to refer to the same or like parts. As used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "or," and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "an antibody" includes a plurality of such antibodies or one or more antibodies and equivalents thereof known to those skilled in the art. Furthermore, all numbers expressing quantities of ingredients, reaction conditions, purity, polypeptide and polynucleotide lengths, and so forth, used in the specification, are modified by the term "about," unless otherwise indicated. Accordingly, the numerical parameters set forth in the specification and claims are approximations that may vary depending upon the desired properties of the present invention.

EXAMPLES

Example 1: Production of Monoclonal and Humanized DLL4 Antibodies

Antigen Production

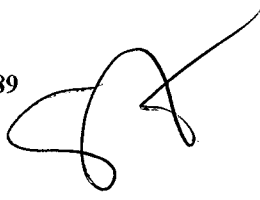
[0182] A recombinant polypeptide fragment of the extracellular domain of human DLL4 was generated as an antigen for antibody production. Standard recombinant DNA

technology was used to isolate a polynucleotide encoding amino acids 1-522 of DLL4 (SEQ ID NO: 25). This polynucleotide was ligated in-frame N-terminal to either a human Fc-tag or histidine-tag and cloned into a transfer plasmid vector for baculovirus mediated expression in insect cells. Standard transfection, infection, and cell culture protocols were used to produce recombinant insect cells expressing the corresponding DLL4 polypeptide (O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)).

[0183] Cleavage of the endogenous signal sequence of human DLL4 was approximated using cleavage prediction software SignalP 3.0, however the actual *in vivo* cleavage point can differ by a couple of amino acids either direction. The predicated cleavage of DLL4 is between amino acids 1 and 26, thus DLL4 antigen protein comprises approximately amino acid 27 through amino acid 522. Antigen protein was purified from insect cell conditioned medium using Protein A and Ni^{++} -chelate affinity chromatography. Purified antigen protein was then dialyzed against PBS (pH=7), concentrated to approximately 1 mg/ml, and sterile filtered in preparation for immunization.

Immunization

[0184] Mice (n=3) were immunized with purified DLL4 antigen protein (Antibody Solutions; Mountain View, CA) using standard techniques. Blood from individual mice was screened approximately 70 days after initial immunization for antigen recognition using ELISA and FACS analysis (described in detail below). The two animals with the highest antibody titers were selected for final antigen boost after which spleen cells were isolated for hybridoma production. Hybridoma cells were plated at 1 cell per well in 96 well plates, and the supernatant from each well screened by ELISA and FACS analysis against antigen protein. Several hybridomas with high antibody titer were selected and scaled up in static flask culture. Antibodies were purified from the hybridoma supernatant using protein A or



protein G agarose chromatography. Purified monoclonal antibodies were again tested by FACS and are isotyped to select for IgG and IgM antibodies.

FACS Analysis

[0185] To select monoclonal antibodies produced by hybridomas clones that recognize native cell-surface DLL4 protein, FACS analysis was used. HEK293 cells were co-transfected with expression vectors encoding a full-length cDNA clone of DLL4 and the transfection marker GFP. Twenty-four to forty-eight hours post-transfection, cells were collected in suspension and incubated on ice with anti-DLL4 antibodies or control IgG to detect background antibody binding. The cells were washed and primary antibodies detected with anti-mouse secondary antibodies conjugated to a fluorescent chromophore. Labeled cells were then sorted by FACS to identify anti-DLL4 antibodies that specifically recognize cell surface expression of native cell-surface DLL4 protein. Monoclonal antibodies 21M14 and 21M18 recognized DLL4 on transfected cells (Fig. 1). Murine antibody 21M18 was deposited with American Tissue Culture Collection (No. X).

[0186] The ability of antibodies directed towards DLL4 to interfere with the interaction between DLL4 and Notch was next determined using flow cytometry. HEK 293 cells stably transduced with DLL4 cDNA were incubated with either Notch1-EGF10-15-Fc or control protein-Fc in the presence of anti-DLL4 or control antibodies. Binding of Fc fusion proteins to cells expressing DLL4 was detected by PE-conjugated goat anti-Fc antibody and flow cytometry. The ability of anti-DLL4 antibodies inhibit the binding of Notch to DLL4 was thus determined by a decrease in fluorescence intensity. As shown in Figure 2A, inhibition of Notch binding was observed with murine antibodies 21M14 and 21M18, but not 21M12. Furthermore, murine 21M18 specifically binds human not murine DLL4, and blocks binding of human DLL4 but not murine DLL4 binding to cells expressing

Notch1 (Fig. 2B). These data indicate that 21M18 in xenograft experiments targets human DLL4 expressed on the tumor cells and not murine DLL4 expressed on the vasculature.

Epitope Mapping

[0187] To identify antibodies that recognize specific regions of the DLL4 extracellular domain, epitope mapping was performed. Mammalian expression plasmid vectors comprising a CMV promoter upstream of polynucleotides that encode a nested series of deletion fragments of the extracellular domain of DLL4 fused to Fc protein were generated using standard recombinant DNA technology. Additional constructs that encoded fragments of DLL4 that were chimera of human and mouse DLL4 fused to Fc protein were also generated using standard recombinant DNA technology. A further series of DLL4-fc fusion proteins were designed that included specific amino acid substitutions. These recombinant fusion proteins were expressed in transiently transfected HEK 293 cells from which conditioned medium was collected twenty-four to forty-eight hours post-transfection for ELISA. The DLL4 fusion protein fragments were captured on plates coated with anti-human Fc antibodies. Anti-DLL4 antibodies were then allowed to interact with the bound DLL4 fragments and binding was measured by subsequent incubation with HRP conjugated anti-mouse antibody and detection of HRP activity (Figure 3A). As shown in Figure 3, monoclonal murine antibodies 21M14 and 21M18 recognize the epitope contained within amino acids 1-217 of DLL4. This region contains a motif termed the "DSL (Delta/Serrate/lag-2)" domain present in several Notch ligands (Tax et al., 1994, *Nature* 368:150-4). Additionally, anti-DLL4 mAbs were examined for binding to DLL4 fusion protein fragments by western blot analysis (Fig. 3B). This work demonstrates the human specific binding of 21M18 to DLL4 within amino acids 1-154 in the presence of a DSL domain present within amino acids 155-217. This demonstrates a previously unappreciated importance of this N-terminal sequence to DLL4 function. This work is summarized in

schematic form (Fig. 3C) with 21M18 binding or lack of binding denoted by a "+" or "-" respectively. The binding of 21M18 was further characterized by examination of binding of 21M18 to a series of DLL4 protein fragments (DLL4dom1-6) containing specific amino acid substitutions swapping the human DLL4 amino acids for the corresponding murine amino acids. These fusion proteins were screened for binding to 21M18 by ELISA. Several positions were identified as important for 21M18 binding as shown (Fig. 3D). 21M18 displays impaired binding to DLL4 protein fragments with substitutions at amino acids 68, 69, and 71 (replacement of valine, valine, and proline) or at amino acids 142 and 144 (replacement of lysine and alanine). In contrast a distinct antibody 21M21 binds to an epitope contained within the DSL region (Fig. 3E), but this antibody does not impact DLL4 function as shown in Figure 6, demonstrating that binding to DSL does not predict a functional antibody.

Chimeric Antibodies

[0188] After monoclonal antibodies that specifically recognize DLL4 are identified, these antibodies are modified to overcome the human anti-mouse antibody (HAMA) immune response when rodent antibodies are used as therapeutics agents. In certain embodiments, the variable regions of the heavy-chain and light-chain of the selected monoclonal antibody are isolated by RT-PCR from hybridoma cells and ligated in-frame to human IgG₁ heavy-chain and kappa light chain constant regions, respectively, in mammalian expression vectors. Alternatively a human Ig expression vector such as TCAE 5.3 is used that contains the human IgG₁ heavy-chain and kappa light-chain constant region genes on the same plasmid (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Expression vectors encoding chimeric heavy- and light-chains are then co-transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells for chimeric antibody production. Immunoreactivity and affinity of chimeric antibodies are compared to parental murine antibodies by ELISA and FACS.

Humanized Antibodies

[0189] In certain embodiments, humanized antibodies against DLL4 are generated. The variable domains of the murine monoclonal antibody 21M18 were isolated and sequenced from the hybridoma line using degenerate PCR essentially as described in Larrick, J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 1250 and Jones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9: 88. Human heavy and light chain variable framework regions likely to be structurally similar to the parental 21M18 antibody amino acid sequences are then chosen as the human framework regions for humanization. To identify the candidate human framework regions, the predicted protein sequences encoded by the V_H and V_L murine variable domains of 21M18 are compared with human antibody sequences encoded by expressed human cDNA using BLAST searches for human sequence deposited in Genbank. Using this method, expressed human cDNA sequences (e.g. genbank AY393019, DC295533) are selected for further analysis in designing a heavy chain framework.

[0190] The amino acid differences between candidate humanized framework heavy chains and the parent murine monoclonal antibody 21M18 heavy chain are evaluated for likely importance, and a judgment made as to whether each difference in position contributes to proper folding of the 21M18 antibody. This analysis is guided by examination of solved crystal structures of other antibody fragments (e.g. the structure of fab 2E8 as described in Trakhanov et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28). Structures are modeled using computer software including Jmol, quick PDB, and Pymol. Consideration is given to the potential impact of an amino acid at a given position on the packing of the β -sheet framework, the interaction between the heavy and light chain variable domains, the degree of solvent exposure of the amino acid side chain, and the likelihood that an amino acid would impact the positioning of the CDR loops. From this analysis, five candidate V_H chains fused in-frame to the human IgG2 constant region are chemically synthesized. The candidate

heavy chains comprise: i) of a functional human framework containing selected substitutions within the synthetic framework region based on analysis of likely impact on 21M18 binding function and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 1, 2, and 5).

[0191] Similarly, amino acid differences between a selected human framework IGK(V)4-1 light chain and the parent murine monoclonal antibody 21M18 light chain are identified, and a judgment is then made as to whether each difference in position contributes to proper folding of the 21M18 antibody. From this analysis, five candidate V_L chains are chemically synthesized. The first candidate light chain comprises: i) a fully IGK(V)4-1 human framework and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 9, 10, and 11). The four additional candidate light chains comprise: i) the IGK(V)4-1 human framework region with an increasing number of 21M18 murine residues retained in the framework region and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 9, 10, and 11).

[0192] The functionality of each candidate variant humanized heavy and light chain is tested by cotransfection into mammalian cells. Each of the five candidate humanized 21M18 heavy chains described above is cotransfected with the murine 21M18 light chain cDNA into HEK 293 cells, and conditioned media is assayed for DLL4 antigen binding activity by ELISA. The 21M18 heavy chain variant exhibiting the most robust binding is selected. This variant—"21M18 H2"—contains, in addition to murine CDRs, substitutions at 6 framework positions within the V_H framework, Kabat positions 16, 20, 27, 28, 38, and 48 (Fig. 4A). The 21M18 H2 humanized heavy chain is then cotransfected with each of the five candidate humanized light chains into HEK293 cells, and conditioned media is again assayed for antigen binding by ELISA. A single light chain variant is found to exhibit better binding than the other candidates—"21M18 L2"—retaining murine residues at Kabat positions 22 and 36 (Fig. 5).

[0193] Next, the isolated cysteine residue in CDR2 H2 (SEQ ID NO: 2) is altered. Specifically, two heavy chain variants of H2 are synthesized with the cysteine residue at Kabat position 52a modified to a serine (variant H7; SEQ ID NO: 3) or a valine (variant H9; SEQ ID NO: 4) residue. These heavy chains are cotransfected into HEK293 cells with L2, and conditioned media again assayed. Both variants (21M18 H7L2 and 21M18 H9L2) demonstrate specific antigen binding by ELISA. Thus 21M18 heavy chain CDR2 comprises SEQ ID NO: 2, 3, or 4 in which the residue at Kabat position 52a comprises a cysteine, serine, or valine residue.

[0194] In certain embodiments, humanized antibodies against DLL4 were generated. The variable domains of the murine monoclonal antibody 21M18 were isolated and sequenced from the hybridoma line using degenerate PCR essentially as described in Larrick, J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 1250 and Jones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9: 88. Human heavy and light chain variable framework regions most similar to the parental 21M18 antibody amino acid sequences were then chosen as the human framework regions for humanization. To identify the most similar human framework regions, the predicted protein sequences encoded by the V_H and V_L murine variable domains of 21M18 were compared with Ig variable domains encoded by the human genome using BLAST searches for human genomic sequence deposited in Genbank. Using this method, IGH(V)1-18 was chosen as the human heavy chain framework region and IGK(V)4-1 was chosen as the human light chain framework region.

[0195] The amino acid differences between the selected human framework IGH(V)1-18 heavy chain and the parent murine monoclonal antibody 21M18 heavy chain were identified, and a judgment was then made as to whether each difference in position contributed to proper folding of the 21M18 antibody. This analysis was guided by examination of solved crystal structures of other antibody fragments (e.g. the structure of fab

2E8 as described in Trakhanov et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28). Structures were modeled using computer software including Jmol, quick PDB, and Pymol. Consideration was given to the potential impact of an amino acid at a given position on the packing of the β -sheet framework, the interaction between the heavy and light chain variable domains, the degree of solvent exposure of the amino acid side chain, and the likelihood that an amino acid would impact the positioning of the CDR loops. From this analysis, five candidate V_H chains fused in-frame to the human IgG2 constant region were chemically synthesized. The first candidate heavy chain comprised: i) a fully IGH(V)1-18 human framework and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 1, 2, and 5). The four additional candidate heavy chains comprised: i) the IGH(V)1-18 human framework region with an increasing number of 21M18 murine residues retained in the framework region and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 1, 2, and 5).

[0196] Similarly, amino acid differences between the selected human framework IGK(V)4-1 light chain and the parent murine monoclonal antibody 21M18 light chain were identified, and a judgment was then made as to whether each difference in position contributed to proper folding of the 21M18 antibody. From this analysis, five candidate V_L chains were chemically synthesized. The first candidate light chain comprised: i) a fully IGK(V)4-1 human framework and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 9, 10, and 11). The four additional candidate light chains comprised: i) the IGK(V)4-1 human framework region with an increasing number of 21M18 murine residues retained in the framework region and ii) the parental 21M18 murine antibody CDRs (SEQ ID NOs: 9, 10, and 11).

[0197] The functionality of each candidate variant humanized heavy and light chain was tested by cotransfection into mammalian cells. Each of the five candidate humanized 21M18 heavy chains described above was cotransfected with the murine 21M18 light chain

cDNA into HEK 293 cells, and conditioned media was then assayed for DLL4 antigen binding activity by ELISA. The 21M18 heavy chain variant exhibiting the most robust binding was selected. This variant—"21M18 H2"—contained, in addition to murine CDRs, murine residues at five framework positions, Kabat positions 20, 28, 38, 48, and 69 (Fig. 4). The 21M18 H2 humanized heavy chain was then cotransfected with each of the five candidate humanized light chains into HEK293 cells, and conditioned media was again assayed for antigen binding by ELISA. A single light chain variant was found to exhibit better binding than the other candidates—"21M18 L2"—retaining murine residues at Kabat positions 22 and 36 (Fig. 5).

[0198] Next, the isolated cysteine residue in CDR2 H2 (SEQ ID NO: 2) was altered. Specifically, two heavy chain variants of H2 were synthesized with the cysteine residue at Kabat position 52a modified to a serine (variant H7; SEQ ID NO: 3) or a valine (variant H9; SEQ ID NO: 4) residue. These heavy chains were cotransfected into HEK293 cells with L2, and conditioned media was again assayed. Both variants (21M18 H7L2 and 21M18 H9L2) demonstrated specific antigen binding by ELISA. Thus 21M18 heavy chain CDR2 comprises SEQ ID NO: 2, 3, or 4 in which the residue at Kabat position 52a comprises a cysteine, serine, or valine residue.

[0199] The humanized 21M18 antibodies were then further characterized. Specifically, the binding affinity of humanized 21M18 antibodies purified by protein A chromatography was determined using Biacore. Affinity was determined to be approximately 0.33 nM for 21M18 variant H2L2.

[0200] The humanized 21M18 antibodies were deposited with ATCC (21M18 H9L2, ATCC deposit no. PTA-8427 and 21M18 H7L2, ATCC deposit no. PTA-8425, deposited May 10, 2007).

95

Human Antibodies

[0201] In some embodiments, human antibodies that specifically recognize the extracellular domain of DLL4 are isolated using phage display technology. A synthetic antibody library containing human antibody variable domains is screened for specific and high affinity recognition of the DLL4 antigen described above. CDR cassettes in the library are specifically exchanged via unique flanking restriction sites for antibody optimization. Optimized human variable regions are then cloned into an Ig expression vector containing human IgG₁ heavy-chain and kappa light-chain for expression of human antibodies in mammalian CHO cells.

Example 2: *In Vitro* Assays to Evaluate Antibodies against DLL4

[0202] This example describes representative *in vitro* assays to test the activity of antibodies generated against DLL4 on cell proliferation, Notch pathway activation, and cytotoxicity.

Proliferation Assay

[0203] The expression of DLL4 by different cancer cell lines is quantified using Taqman analysis. Cell lines identified as expressing DLL4 are plated at a density of 10^4 cell per well in 96-well tissue culture microplates and allowed to spread for 24 hours. Subsequently cells are cultured for an additional 12 hours in fresh DMEM with 2% FCS at which point anti-DLL4 antibodies versus control antibodies are added to the culture medium in the presence of 10 μ mol/L BrdU. Following BrdU labeling, the culture media is removed, and the cells fixed at room temperature for 30 minutes in ethanol and reacted for 90 minutes with peroxidase-conjugated monoclonal anti-BrdU antibody (clone BMG 6H8, Fab fragments). The substrate is developed in a solution containing tetramethylbenzidine and stopped after 15 minutes with 25 μ l of 1 mol/L H₂SO₄. The color reaction is measured with

gb

an automatic ELISA plate reader using a 450 nm filter (UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). All experiments are performed in triplicate. The ability of anti-DLL4 antibodies to inhibit cell proliferation compared to control antibodies is determined.

Pathway Activation Assay

[0204] In certain embodiments, the ability of antibodies against DLL4 to block activation of the Notch signaling pathway is determined *in vitro*. HeLa cells cultured in DMEM supplemented with antibiotics and 10% FCS were co-transfected with 1) Hes1-Luc reporter vector containing the Hes1 promoter upstream of a firefly luciferase reporter gene to measure Notch signaling levels (Jarriault et al., 1995, *Nature* 377:355-8) in response to DLL4 ligand and 2) a Renilla luciferase reporter (Promega; Madison, WI) as an internal control for transfection efficiency. Transfected cells were then added to culture plates coated overnight with 10 µg/ml DLL4-Fc protein. Antibodies to DLL4 were then added to the cell culture medium. Forty-eight hours following transfection, luciferase levels were measured using a dual luciferase assay kit (Promega; Madison, WI) with firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity. The ability of antibodies to inhibit DLL4 induced Notch pathway activation was thus determined. Inhibition of DLL4 activation of Notch pathway activation was observed with anti-DLL4 murine antibodies 21M14 and 21M18 (Fig. 6). In contrast, anti-DLL4 antibody 21M21 did not inhibit Notch binding (Fig. 6) despite binding to the DSL domain of DLL4 (Fig. 3E).

[0205] In certain embodiments, the ability of anti-DLL4 antibodies to modulate downstream gene activation was determined. C8 colon tumor cells from animals treated with murine 21M18 antibodies (described in detail below) were isolated and expression of Notch pathway genes HES1 and ATOH-1 was determined by RT-PCR. Total RNA from tumor tissue was isolated with RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) according to

manufacturer's instructions. The quantity of RNA samples was determined by the ratio of 260nm/280 nm. The integrity of RNA was determined by running an aliquot of the RNA sample on a denaturing agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr). The ratio of 28s to 18s rRNA on the gel was visualized using a FluorChem camera delivered with the AphaEasa FC software. RNA samples were eluted in RNase-free water and stored at -80°C. The real-time RT-PCR was done with a dual-fluorescent nonextendable probe containing 3'-TAMRA FAM (6-carboxyfluorescein) reporter dye and a 3'-TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine). One hundred micrograms of total RNA was used for real-time PCR in a final volume of 25 uL containing reverse transcriptase, 1X Tagman buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the primer/probe mixture. Reactions were carried out in an ABI 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA): 30 min at 48°C, 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1min at 60°C. The results were analyzed using the SDS2.3 software (Applied Biosystems). All primer and probe sets were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA). The level of expression of target genes were normalized to the expression level of the house keeping gene *Gus B* and expressed as relative quantity. Treatment with anti-DLL4 murine 21M18 antibodies reduced expression of HES1 and increased expression of ATOH-1 as compared to control treated tumors (Fig. 7A).

[0206] In some embodiments, mouse lineage-depleted OMP-C11 tumor cell colonies were established using culture conditions known to maintain tumorigenic cells in vitro. These tumor cell colonies were overlaid with 3T3 cells without (3T3) or including human DLL4 (DLL4) overexpressed on the cell surface in the presence or absence of 10 µg/mL murine 21M18 or 5 µM gamma-secretase inhibitor (GSI; i.e. DBZ). A no overlay control was also included. While 3T3-DLL4 cells induced HES1 and suppressed ATOH1

gene expression (shown as ratio of HES1:ATOH1), either 21M18 or GSI alone inhibited DLL4-induced Notch target gene changes.

Complement-dependent Cytotoxicity Assay

[0207] In certain embodiments, cancer cell lines expressing DLL4 or cancer stem cells isolated from a patient sample passaged as a xenograft in immunocompromised mice (as described in detail below) are used to measure complement dependent cytotoxicity (CDC) mediated by an antibody against DLL4. Cells are suspended in 200 μ l RPMI 1640 culture medium supplemented with antibiotics and 5% FBS at 10^6 cells/ml. Suspended cells are then mixed with 200 μ l serum or heat-inactivated serum with antibodies against DLL4 or control antibodies in triplicate. Cell mixtures are incubated for 1 to 4 hours at 37°C in 5% CO₂. Treated cells are then collected, resuspended in 100 μ l FITC-labeled annexin V diluted in culture medium and incubated at room temperature for 10 minutes. One hundred microliters of a propidium iodide solution (25 μ g/ml) diluted in HBSS is added and incubated for 5 minutes at room temperature. Cells are collected, resuspended in culture medium and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry of FITC stained cells provides total cell counts, and propidium iodide uptake by dead cells as a percentage of total cell numbers is used to measure cell death in the presence of serum and antibodies against DLL4 compared to heat-inactivated serum and control antibodies. The ability of anti-DLL4 antibodies to mediated complement-dependent cytotoxicity is thus determined.

Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Assay

[0208] In certain embodiments, cancer cell lines expressing DLL4 or cancer stem cells isolated from a patients sample passaged as a xenograft in immunocompromised mice (as described in detail below) are used to measure antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by an antibody against DLL4. Cells are suspended in 200 μ l phenol red-free RPMI 1640 culture medium supplemented with antibiotics and 5% FBS at 10^6 cells/ml.

all

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are isolated from heparinized peripheral blood by Ficoll-Paque density gradient centrifugation for use as effector cells. Target cells (T) are then mixed with PBMC effector cells (E) at E/T ratios of 25:1, 10:1, and 5:1 in 96-well plates in the presence of at least one DLL4 antibody or a control antibody. Controls include incubation of target cells alone and effector cells alone in the presence of antibody. Cell mixtures are incubated for 1 to 6 hours at 37°C in 5% CO₂. Released lactate dehydrogenase (LDH), a stable cytosolic enzyme released upon cell lysis, is then measured by a colorimetric assay (CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay; Promega; Madison, WI). Absorbance data at 490 nm are collected with a standard 96-well plate reader and background corrected. The percentage of specific cytotoxicity is calculated according to the formula: % cytotoxicity = 100 x (experimental LDH release – effector spontaneous LDH release – target spontaneous LDH release) / (target maximal LDH release – target spontaneous LDH release). The ability of antibodies against DLL4 to mediated antibody dependent cellular cytotoxicity is thus determined.

Example 3: *In Vivo* Prevention of Tumor Growth Using Anti-DLL4 Antibodies

[0209] This example describes the use of anti-DLL4 antibodies to prevent tumor growth in a xenograft model. In certain embodiments, tumor cells from a patient sample (solid tumor biopsy or pleural effusion) that have been passaged as a xenograft in mice are prepared for repassaging into experimental animals. Tumor tissue is removed under sterile conditions, cut up into small pieces, minced completely using sterile blades, and single cell suspensions obtained by enzymatic digestion and mechanical disruption. Specifically, pleural effusion cells or the resulting tumor pieces are mixed with ultra-pure collagenase III in culture medium (200-250 units of collagenase per mL) and incubated at 37°C for 1-4 hours with pipetting up and down through a 10-mL pipette every 15-20 minutes. Digested cells are

filtered through a 40 μ M nylon mesh, washed with Hank's buffered saline solution (HBSS) containing 2% heat-inactivated calf serum (HICS) and 25mM HEPES (pH 7.4). Dissociated tumor cells are then injected subcutaneously into the mammary fat pads of NOD/SCID mice to elicit tumor growth.

[0210] In certain embodiments, dissociated tumor cells are first sorted into tumorigenic and non-tumorigenic cells based on cell surface markers before injection into experimental animals. Specifically, tumor cells dissociated as described above are washed twice with Hepes buffered saline solution (HBSS) containing 2% heat-inactivated calf serum (HICS) and resuspended at 10^6 cells per 100 μ l. Antibodies are added and the cells incubated for 20 minutes on ice followed by two washes with HBSS/2% HICS. Antibodies include anti-ESA (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), anti-CD44, anti-CD24, and Lineage markers anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64, and -CD140b (collectively referred to as Lin; BD Biosciences, San Jose, CA). Antibodies are directly conjugated to fluorochromes to positively or negatively select cells expressing these markers. Mouse cells are eliminated by selecting against H2Kd+ and murine CD45+ cells, and dead cells are eliminated by using the viability dye DAPI. Flow cytometry is performed on a FACSaria (BD Biosciences, San Jose, CA). Side scatter and forward scatter profiles are used to eliminate cell clumps. Isolated ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- tumorigenic cells are then injected subcutaneously into NOD/SCID mice to elicit tumor growth.

[0211] In certain embodiments, anti-DLL4 antibodies were analyzed for their ability to reduce the growth of UM-C4 colon tumor cells. Dissociated UM-C4 cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. The day after tumor cell injection, animals were injected intraperitoneal (i.p.) with 10 mg/kg murine 21M18 anti-DLL4 antibodies (n=5) or PBS (n=10) two times per week for the duration of the experiment. Tumor growth was monitored weekly until growth was detected,

after which point tumor growth was measured twice weekly for a total of 8 weeks. Treatment with 21M18 antibody reduced tumor growth by 54% compared to PBS injected controls (Fig. 8).

[0212] The ability of anti-DLL4 antibodies to affect proliferation in vivo was then determined. C8 colon tumors from animals treated with murine 21M18 antibodies or control antibodies were isolated and expression of Ki67, a marker of cell proliferation, determined by immunocytochemistry. Specifically, formalin-fixed, paraffin-embedded tumors were cut into 4-um thick sections. Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in distilled water. Immunohistochemistry was performed according to standard methods. Briefly, sections were immersed in citrate buffer (pH 6) in a water bath for 20 minutes in the Decoking chamber to retrieve antigens. The slides were cooled for about 45 minutes and rinsed in PBS. Sections were incubated with hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 10 minutes at room temperature to remove endogenous peroxidase prior to addition of primary antibody. The rabbit anti-human Ki67 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) at 1:50 dilution in horse dilution buffer (1% NHS, 1% BSA, 0.1% Tx-100, 0.05% NaN₃ in PBS) was added to each section and incubated for 1 hour or overnight at 4°C. Slides were rinsed 3 times in washing buffer (Gelatine 10%, Tx-100 10%, in PBS) for 5 minutes each. The anti-rabbit secondary antibody conjugated with HRP solution (Immpress anti-Rabbit pre-diluted, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) was added to the slides and incubated for 30 minutes. After extensive wash with washing buffer, Vector Nova Red (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) was added. The slides were rinsed with water, counterstained with hematoxilin and mounted with permanent mounting medium (Vectamount, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Treatment with anti-DLL4 murine 21M18 antibodies reduced the number of cells expressing Ki67 as compared to control treated tumors (Fig. 9).

102

Example 4: *In Vivo* Prevention and Treatment of Tumor Growth Using Anti-DLL4 Antibodies in Combination Therapy**DLL-4 Antibodies in Combination with Fluorouracil**

[0213] In certain embodiments, anti-DLL4 antibodies were analyzed in combination with chemotherapy for the ability to reduce growth of UM-C4 colon tumor cells *in vivo*. Dissociated UM-C4 cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. The day after tumor cell injection, animals were injected intraperitoneal (i.p.) with 10 mg/kg murine 21M18 anti-DLL4 antibodies or PBS two times per week for the duration of the experiment with or without concurrent treatment with the anti-metabolite chemotherapy agent fluorouracil (5-FU) administered one time per week. Tumor growth was monitored weekly until growth was detected, after which point tumor growth was measured twice weekly for a total of 8 weeks. Treatment with anti-DLL4 murine 21M18 antibodies in combination with 5-FU reduced tumor growth to a greater degree than either treatment alone (Fig. 10).

DLL-4 Antibodies in Combination with EGFR or VEGF Antibodies

[0214] In certain embodiments, anti-DLL4 antibodies were tested in combination with anti-EGF receptor (EGFR) antibodies for the ability to affect tumor take frequency *in vivo*. Dissociated UM-C4 cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. The day after tumor cell injection, animals (n=10) were injected intraperitoneal (i.p.) with 10 mg/kg murine 21M18 anti-DLL4 antibodies, anti-EGFR antibodies, a combination of anti-DLL4 and anti-EGFR antibodies, or PBS. Tumors were detected in all animals treated with anti-DLL4 or anti-EGFR antibodies and 9 out of 10 control animals. In contrast, only 2 out of 10 animals treated with a combination of anti-DLL4 and anti-EGFR antibodies had detectable tumors several weeks after treatment (Fig. 11). Furthermore, treatment with anti-DLL4 murine 21M18 antibodies

103

in combination with anti-EGFR antibodies reduced the frequency of tumorigenesis versus either treatment alone (Fig. 11).

[0215] In certain embodiments, anti-DLL4 antibodies were tested in combination with anti-EGF receptor (EGFR) antibodies for the ability to affect tumor take frequency *in vivo*. C17 tumor cells were implanted in mice (n=10 per group) and treatment was initiated two day later with either control antibody, murine 21M18, anti-VEGF antibodies, or the combination of both antibodies. Each antibody was dosed at 10 mg/kg, given twice a week. Both 21M18 and anti-VEGF reduced tumor growth, and the combination was more effective than either antibody alone (Fig. 18).

DLL-4 Antibodies in Combination with Irinotecan

[0216] In certain embodiments, anti-DLL4 antibodies were tested in combination with the chemotherapeutic Irinotecan. In some embodiments, dissociated OMP-C8 tumor cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. The day after tumor cell injection, animals were injected intraperitoneal (i.p.) with 10 mg/kg murine 21M18 anti-DLL4 antibodies or control antibody two times per week for the duration of the experiment with or without concurrent treatment with the chemotherapy agent Irinotecan administered one time per week at a dosage of 7.5 mg/kg. Tumor growth was monitored weekly until growth was detected, after which point tumor growth was measured twice weekly. Treatment with anti-DLL4 21M18 antibodies in combination with Irinotecan reduced tumor growth to a greater degree than either treatment alone (Fig. 12A). And, while tumor growth continued or accelerated in most animals after cessation of weekly treatment with 7.5 mg/kg Irinotecan alone, the combination of 10 mg/kg, twice per week, anti-DLL4 21M18 and 7.5 mg/kg weekly Irinotecan prevented further colon tumor growth after treatment cessation on day 56 for over five weeks (Fig. 13).

[0217] In certain embodiments, humanized H7L2 21M18 anti-DLL4 antibodies were tested in combination with Irinotecan. In some embodiments, dissociated C8 tumor cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. The day after tumor cell injection, animals were injected intraperitoneal (i.p.) with 10 mg/kg humanized 21M18 anti-DLL4 antibodies, murine 21M18 antibodies, or control antibodies two times per week for the duration of the experiment with or without concurrent treatment with the chemotherapy agent Irinotecan administered one time per week at a dosage of 7.5 mg/kg. Tumor growth was monitored weekly until growth was detected, after which point tumor growth was measured twice weekly. Treatment with humanized anti-DLL4 21M18 antibodies in combination with Irinotecan showed similar efficacy against tumor growth as murine 21M18 (Fig. 12B).

[0218] In some embodiments, combination anti-DLL4 murine 21M18 and Irinotecan treatment was used to treat established colon tumors. Dissociated C8 cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. When the injected cells produced tumors of approximately 60 mm³, treatment was commenced. Animals were injected intraperitoneal (i.p.) with 10 mg/kg murine 21M18 anti-DLL4 antibodies or a control two times per week for the duration of the experiment with or without concurrent treatment with the chemotherapy agent Irinotecan administered one time per week at a dosage of 7.5 mg/kg. Treatment with anti-DLL4 murine 21M18 antibodies in combination with Irinotecan reduced the growth of established colon tumors to a greater degree than either treatment alone (Fig. 14).

[0219] In some embodiments, combination therapy followed by antibody treatment delayed tumor recurrence. Dissociated C8 cells (10,000 per animal) were injected subcutaneously into the right flank region of 6-8 week old NOD/SCID mice. When the injected cells produced tumors of approximately 150 mm³, treatment was commenced.

Animals were administered intraperitoneal (i.p.) 10 mg/kg murine 21M18 anti-DLL4 or control antibodies two times per week in combination with Irinotecan at 7.5 mg/kg once weekly for a total of 32 days. Combination treatment was then discontinued and antibodies were treated with DLL4 21M18 or control antibodies for the remainder of the experiment. Treatment with anti-DLL4 21M18 antibodies following combination therapy significantly delayed the recurrence of tumor growth compared to control treated animals (Fig. 16). Individual tumor volume is also shown at 47 days after termination of Irinotecan treatment (Fig. 17).

DLL-4 Antibody Reduction of Cancer Stem Cell Frequency Is Enhanced by Irinotecan

[0220] In certain embodiments, the ability of anti-DLL4 21M18 antibodies alone or in combination with Irinotecan to reduce the frequency of cancer stem cells was determined using a limiting dilution analysis. C8 colon tumors from mice treated with either control or DLL4 murine 21M18 antibodies, Irinotecan, or DLL4 murine 21M18 antibodies in combination with Irinotecan as described above were isolated after 38 days of treatment. Isolated tumors (n=3 per experimental group) were processed as described below. Tumors were removed, and minced with a sterile razor blade. To obtain single cell suspensions, a digestion solution containing Collagenase/Hyaluronidase:Dispase (1:1:8 of 10X) in MEBM medium (Cambrex, East Rutherford, NJ) with a 1:100 dilution of DNaseI (Worthington, Lakewood, NJ) was mixed with the tumor suspension and incubated for 1 hour at 37°C. Cells were centrifuged and resuspended in 1ml of ACK medium (0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA in distilled water) on ice for 2 minutes to remove red blood cells. Cells were centrifuged and resuspended at a concentration of 1x10⁷ cells/ml in FACS buffer and then incubated with biotinylated mouse antibodies (α-mouse CD45-biotin 1:200 dilution and rat α-mouse H₂Kd-biotin 1:100 dilution, BioLegend, San Diego, CA) on ice for 30 minutes followed by addition of strepavidin magnetic beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) to remove

mouse cells. The remaining human cells in the suspension were collected, counted and diluted to the desired concentration for further use. Serial dilutions of human cells were then re-injected into immuno-compromised mice. Specifically, mice were injected with 900, 300, 100, or 50 isolated human tumor cells in the right flank region (n=10 per group). Tumor volume was assessed twice per week.

[0221] Upon termination of the study on day 81, the percentage of mice with detectable tumors was decreased in all groups injected with DLL4 21M18 antibody treated tumor cells and even further decreased in DLL4 21M18-Irinotecan treated tumor cells compared to those treated with either control or Irinotecan alone (Fig. 15A). Using these tumor generation frequencies, the stem cell frequency was calculated using Poisson statistics provided by L-CalculTM software (downloadable from <http://www.stemcell.com/search/default.asp>). Briefly, based on Poisson distribution statistics, exactly one stem cell exists among the known number of injected cells if 37% of the animals fail to develop tumors. Treatment of tumors with Irinotecan alone increased the number of cancer stem cells from 1:93 in control treated tumors to 1:82. In contrast, anti-DLL4 antibodies reduced the cancer stem cell frequency from 1:93 in control treated tumors to 1:238 in DLL4 antibody treated tumors and to 1:573 in combination DLL4 21M18-Irinotecan treated tumor cells (Fig. 15B).

Example 5: *In Vivo* Treatment of Tumors Using Anti-DLL4 Antibodies

[0222] This example describes the use of humanized anti-DLL4 21M18 antibodies to treat cancer in a xenograft model. In certain embodiments, tumor cells from a patient sample (solid tumor biopsy or pleural effusion) that have been passaged as a xenograft in mice are prepared for repassaging into experimental animals. Tumor tissue is removed, cut up into small pieces, minced completely using sterile blades, and single cell suspensions

107

obtained by enzymatic digestion and mechanical disruption. Dissociated tumor cells are then injected subcutaneously either into the mammary fat pads, for breast tumors, or into the flank, for non-breast tumors, of NOD/SCID mice to elicit tumor growth. Alternatively, ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- tumorigenic tumor cells are isolated as described in detail above and injected.

[0223] Following tumor cell injection, animals are monitored for tumor growth. Once tumors reach an average size of approximately 100 mm³, antibody treatment begins. Each animal receives 100 µg DLL4 21M18 humanized antibodies or control antibodies i.p. two to five times per week for a total of 6 weeks. Tumor size is assessed twice a week during these 6 weeks. The ability of DLL4 humanized antibodies to prevent further tumor growth or to reduce tumor size compared to control antibodies is thus determined.

[0224] At the end point of antibody treatment, tumors are harvested for further analysis. In some embodiments a portion of the tumor is analyzed by immunofluorescence to assess antibody penetration into the tumor and tumor response. A portion of each harvested tumor from anti-DLL4 treated and control antibody treated mice is fresh-frozen in liquid nitrogen, embedded in O.C.T., and cut on a cryostat as 10 µm sections onto glass slides. In some embodiments, a portion of each tumor is formalin-fixed, paraffin-embedded, and cut on a microtome as 10 µm section onto glass slides. Sections are post-fixed and incubated with chromophore labeled antibodies that specifically recognize injected antibodies to detect anti-DLL4 receptor or control antibodies present in the tumor biopsy. Furthermore antibodies that detect different tumor and tumor-recruited cell types such as, for example, anti-VE cadherin (CD144) or anti-PECAM-1 (CD31) antibodies to detect vascular endothelial cells, anti-smooth muscle alpha-actin antibodies to detect vascular smooth muscle cells, anti-Ki67 antibodies to detect proliferating cells, TUNEL assays to detect dying cells, anti-intracellular domain (ICD) Notch fragment antibodies to detect Notch signaling can be used to assess the

effects of antibody treatment on, for example, angiogenesis, tumor growth and tumor morphology.

[0225] In certain embodiments, the effect of anti-DLL4 humanized antibody treatment on tumor cell gene expression is also assessed. Total RNA is extracted from a portion of each harvested tumor from DLL4 antibody treated and control antibody treated mice and used for quantitative RT-PCR. Expression levels of DLL4, Notch receptors, components of the Notch signaling pathway, as well as additional cancer stem cell markers previously identified (e.g. CD44) are analyzed relative to the house-keeping gene GAPDH as an internal control. Changes in tumor cell gene expression upon DLL4 antibody treatment are thus determined.

[0226] In addition, the effect of anti-DLL4 antibody treatment on the presence of cancer stem cells in a tumor is assessed. Tumor samples from DLL4 versus control antibody treated mice are cut up into small pieces, minced completely using sterile blades, and single cell suspensions obtained by enzymatic digestion and mechanical disruption. Dissociated tumor cells are then analyzed by FACS analysis for the presence of tumorigenic cancer stem cells based on ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- surface cell marker expression as described in detail above.

[0227] The tumorigenicity of cells isolated based on ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- expression following anti-DLL4 antibody treatment can then be assessed. ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin- cancer stem cells isolated from DLL4 antibody treated versus control antibody treated mice are re-injected subcutaneously into the mammary fat pads of NOD/SCID mice. The tumorigenicity of cancer stem cells based on the number of injected cells required for consistent tumor formation is then determined.

Example 6: Treatment of Human Cancer Using Humanized Anti-DLL4 Antibodies

[0228] This example describes methods for treating cancer using humanized antibodies against DLL4 to target tumors comprising cancer stem cells and/or tumor cells in which Notch receptor or Notch receptor ligand expression has been detected. The presence of cancer stem cell marker expression can first be determined from a tumor biopsy. Tumor cells from a biopsy from a patient diagnosed with cancer are removed under sterile conditions. In some embodiments the tissue biopsy is fresh-frozen in liquid nitrogen, embedded in O.C.T., and cut on a cryostat as 10 μ m sections onto glass slides. In some embodiments, the tissue biopsy is formalin-fixed, paraffin-embedded, and cut on a microtome as 10 μ m section onto glass slides. Sections are incubated with antibodies against DLL4 to detect protein expression.

[0229] The presence of cancer stem cells can also be determined. Tissue biopsy samples are cut up into small pieces, minced completely using sterile blades, and cells subject to enzymatic digestion and mechanical disruption to obtain a single cell suspension. Dissociated tumor cells are then incubated with anti-ESA, -CD44, -CD24, -Lin, and -DLL4 antibodies to detect cancer stem cells, and the presence of ESA+, CD44+, CD24-/low, Lin-, DLL4+ tumor stem cells is determined by flow cytometry as described in detail above.

[0230] Cancer patients whose tumors are diagnosed as expressing a Notch receptor or Notch receptor ligand are treated with humanized anti-DLL4 antibodies. In certain embodiments, humanized anti-DLL4 antibodies generated as described above are purified and formulated with a suitable pharmaceutical vehicle for injection. In some embodiments, patients are treated with the DLL4 antibodies at least once a month for at least 10 weeks. In some embodiments, patients are treated with the DLL4 antibodies at least once a week for at least about 14 weeks. Each administration of the antibody should be a pharmaceutically effective dose. In some embodiments, between about 2 to about 100 mg/ml of an anti-DLL4 antibody is administered. In some embodiments, between about 5 to about 40 mg/ml of an

110

anti-DLL4 antibody is administered. The antibody can be administered prior to, concurrently with, or after standard radiotherapy regimens or chemotherapy regimens using one or more chemotherapeutic agent, such as oxaliplatin, fluorouracil, leucovorin, or streptozocin.

Patients are monitored to determine whether such treatment has resulted in an anti-tumor response, for example, based on tumor regression, reduction in the incidences of new tumors, lower tumor antigen expression, decreased numbers of cancer stem cells, or other means of evaluating disease prognosis.

[0231] Other embodiments of the invention will be apparent to those skilled in the art from consideration of the specification and practice of the invention disclosed herein. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only, with a true scope and spirit of the invention being indicated by the following claims. All publications, patents and patent applications cited herein are incorporated by reference in their entirety into the disclosure.

///

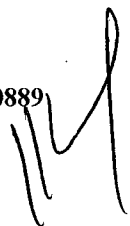
WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope comprising amino acids within human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27), wherein the antibody affects growth of a tumor comprising cancer stem cells.
2. The isolated antibody of claim 1, wherein the human DLL4 epitope is formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DLL4 DSL (SEQ ID NO: 26).
3. The isolated antibody of claim 1, wherein the human DLL4 epitope further comprises amino acids within human DLL4 DSL (SEQ ID NO: 26).
4. The isolated antibody of claim 2, wherein the human DLL4 epitope comprises amino acids 66-73 (QAVVSPGP) of the human DLL4 N-terminal region.
5. The isolated antibody of claim 4, wherein the human DLL4 epitope comprises amino acids V68, V69, and P71 of the human DLL4 N-terminal region.
6. The isolated antibody of claim 2, wherein the human DLL4 epitope comprises amino acids 139-146 (LISKIAIQ) of the human DLL4 N-terminal region.
7. The isolated antibody of claim 6, wherein the human DLL4 epitope comprises amino acids K142 and A144 of the human DLL4 N-terminal region.
8. The isolated antibody of claim 2, wherein the human DLL4 epitope comprises amino acids 66-73 (QAVVSPGP) and 139-146 (LISKIAIQ) of the human DLL4 N-terminal region.
9. The isolated antibody of claim 8, wherein the human DLL4 epitope comprises amino acids V68, V69, P71, K142, and K144 of the human DLL4 N-terminal region.
10. The isolated antibody of any of the preceding claims, wherein the affect is a reduction in tumor volume.
11. The antibody of any of claims 1 to 9, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
12. The antibody of any of claims 1 to 9, wherein the antibody is a chimeric antibody.
13. The antibody of any of claims 1 to 9, wherein the antibody is a humanized antibody.
14. The antibody of any of claims 1 to 9, wherein the antibody is a human antibody.
15. The humanized antibody of claim 13, which is an IgG antibody.
16. The humanized antibody of claim of claim 15, wherein the IgG is IgG₂.
17. The humanized antibody of claim 13, which is an antibody fragment.
18. The humanized antibody of claim 17, wherein the antibody fragment is a Fab fragment.

19. The isolated antibody of any of claims 1 to 9 comprising:
- a heavy chain variable region comprising CDR amino acid sequences CDR1 (SEQ ID NO: 1); CDR2 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4); and CDR3 (SEQ ID NO: 5); and
 - a light chain variable region comprising CDR amino acid sequences CDR1 (SEQ ID NO: 9); CDR2 (SEQ ID NO: 10); and CDR3 (SEQ ID NO: 11).
20. The isolated antibody of claim 19 produced by hybridoma deposited with ATCC on September 28, 2007 and having ATCC deposit no. ____.
21. An antibody that competes for specific binding to human DLL4 with an antibody produced by hybridoma deposited with ATCC on September 28, 2007 and having ATCC deposit no. ____.
22. A humanized antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope comprising amino acids within human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27), wherein the antibody comprises: (i) a heavy chain variable region comprising a nonhuman antigen determination region and a human heavy chain variable framework region, and (ii) a light chain variable region comprising a nonhuman antigen determination region and a human light chain variable framework region.
23. The humanized antibody of claim 22, wherein the human DLL4 epitope is formed by a combination of the human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27) and human DLL4 DSL (SEQ ID NO: 26).
24. The humanized antibody of claim 22, wherein the human DLL4 epitope further comprises amino acids within human DLL4 DSL (SEQ ID NO: 26).
25. The humanized antibody of claim 23, wherein at least one residue in the human heavy chain variable framework region is substituted.
26. The humanized antibody of claim 25, wherein the at least one substitution is a substitution of a residue occupying the corresponding position in an antibody comprising the nonhuman antigen determination region.
27. The humanized antibody of claim 25, wherein five or six residues in the human heavy chain variable framework region are substituted.
28. The humanized antibody of claim 25, wherein the at least one substitution in the human variable framework region is at a position selected from the group consisting of 16H, 20H, 27H, 28H, 38H, and 48H based on the Kabat numbering system.
29. The humanized antibody of claim 25, wherein the at least one substitution in the human variable framework region is at a position selected from the group consisting of 20H, 28H, 38H, 48H, and 69H based on the Kabat numbering system.
30. The humanized antibody of claim 27, wherein positions 16H, 20H, 27H, 28H, 38H, and 48H are substituted based on the Kabat numbering system.

123

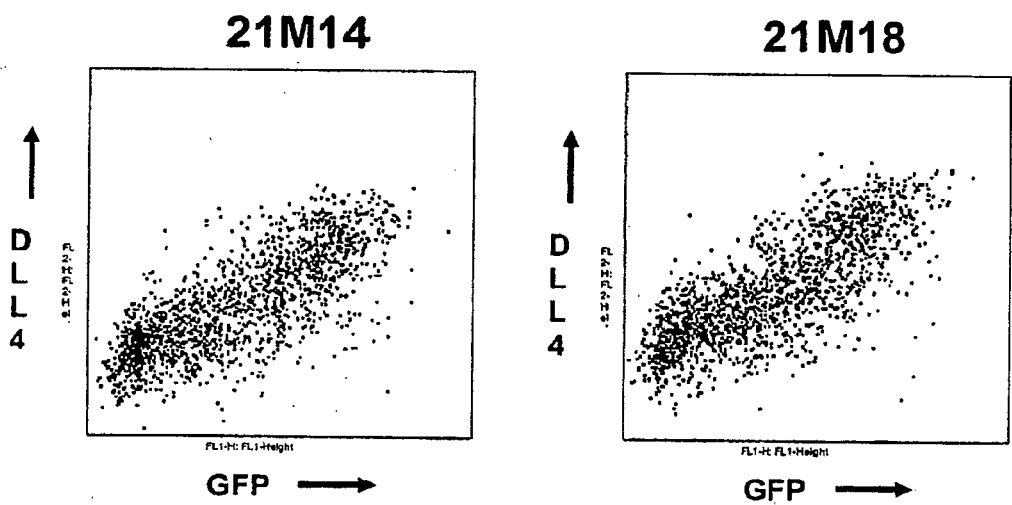
31. The humanized antibody of claim 27, wherein positions 20H, 28H, 38H, 48H, and 69H are substituted based on the Kabat numbering system.
32. The humanized antibody of any one of claims 22 to 31, wherein the heavy chain nonhuman antigen determination region comprises CDR amino acid sequences CDR1 (SEQ ID NO: 1); CDR2 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4); and CDR3 (SEQ ID NO: 5).
33. The humanized antibody of any one of claims 22 to 31, wherein at least one residue in the human light chain variable framework region is substituted.
34. The humanized antibody of claim 33, wherein the at least one substitution is a substitution of a residue occupying the corresponding position in an antibody comprising the nonhuman antigen determination region.
35. The humanized antibody of claim 33, wherein two residues in the human light chain variable framework region are substituted.
36. The humanized antibody of claim 33, wherein the at least one residue in the human variable framework region is at a position selected from the group consisting of 22L and 36L based on the Kabat numbering system.
37. The humanized antibody of claim 35, wherein positions 22L and 36L are substituted based on the Kabat numbering system.
38. The humanized antibody of any one of claims 33 to 37, wherein the light chain nonhuman antigen determination region comprises CDR1 (SEQ ID NO: 9); CDR2 (SEQ ID NO: 10); and CDR3 (SEQ ID NO: 11).
39. The humanized antibody of claim 22, wherein the heavy chain variable region comprises SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8.
40. The humanized antibody of claim 22, wherein the light chain variable region comprises SEQ ID NO: 12.
41. The humanized antibody of claim 22, wherein the heavy chain variable region comprises SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8 and the light chain variable region comprises SEQ ID NO: 12.
42. An isolated antibody that specifically binds to a human DLL4 epitope comprising amino acids within human DLL4 N-terminal region (SEQ ID NO: 27), wherein the antibody inhibits DLL4 binding to a Notch receptor.
43. An antibody that competes for specific binding to human DLL4 with an antibody encoded by the plasmid deposited with ATCC (ATCC deposit no. PTA-8427 or PTA-8425).
44. A humanized antibody encoded by the plasmid deposited with ATCC no. PTA-8427 or PTA-8425.
45. A pharmaceutical composition comprising:

- 
- i. an antibody according to any one of the preceding claims; and
 - ii. a pharmaceutically acceptable carrier.
46. An isolated polynucleotide vector encoding an antibody according to any one of claims 1 to 44.
47. A host cell comprising one or more polynucleotide vectors encoding an antibody according to any one of claims 1 to 44.
48. An antibody of any one of claims 1 to 44 for use in treating cancer.
49. Use of an antibody of any one of claims 1 to 44 in the manufacture of a medicament for treating cancer.
50. The use according to claim 49 wherein the use comprises administering to a patient a therapeutically effective amount of said antibody in combination with a second therapeutic agent.
51. The use according to claim 50, wherein the antibody and second therapeutic agent are given concurrently or sequentially.
52. The use according to claim 50, wherein the second therapeutic agent is a chemotherapeutic agent.
53. The use according to claim 52, wherein the chemotherapeutic agent is Fluorouracil or Irinotecan.
54. The use according to claim 50, wherein the second therapeutic agent is a second therapeutic antibody.
55. The use according to claim 54, wherein the second therapeutic antibody is an anti-EGF receptor antibody or an anti-VEGF antibody.
56. The use according to claim 50, wherein the second therapeutic agent is radiation therapy.
57. A method of diagnosing cancer comprising contacting a patient sample with an antibody of any one of claim 1 to 44, and diagnosing cancer based on the localization of DLL4 expression in the patient sample.
58. A method of manufacturing antibodies of any one of claims 1 to 44, the method comprising:
- i. transforming host cells with a polynucleotide expression vector or vectors encoding the antibody;
 - ii. culturing the host cells under conditions permitting expression of the antibody; and
 - iii. purifying the antibody from the culture medium.
59. A transformed cell line expressing antibodies according to any one of claims 1 to 44.

60. A hybridoma that secretes antibody 21M18 deposited with ATCC on September 28, 2007 and having ATCC deposit no. ____.
61. A plasmid that encodes 21M18 H9L2 (ATCC deposit no. PTA-8427) or 21M18 H7L2 (ATCC deposit no. PTA-8425).
62. A method of producing antibody 21M18 H9L2 or antibody 21M18 H7L2 by culturing cells transfected with the plasmids deposited with ATCC no. PTA-8427 or PTA-8425.
63. A kit comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody of any one of claims 1 to 44, and further comprises a package insert indicating that the composition can be used to treat cancer.

Figure 1

Specific Binding of anti-DLL4 21M18 Antibodies to Native Cell-Surface DLL4 Protein

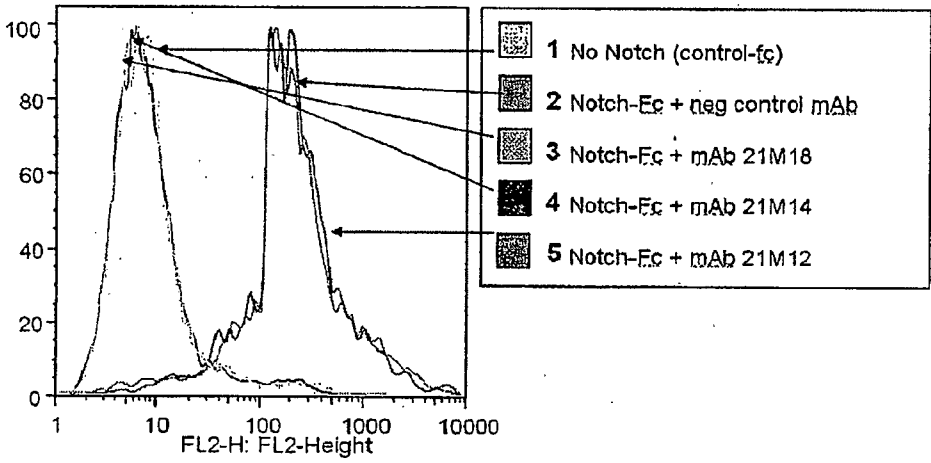


117

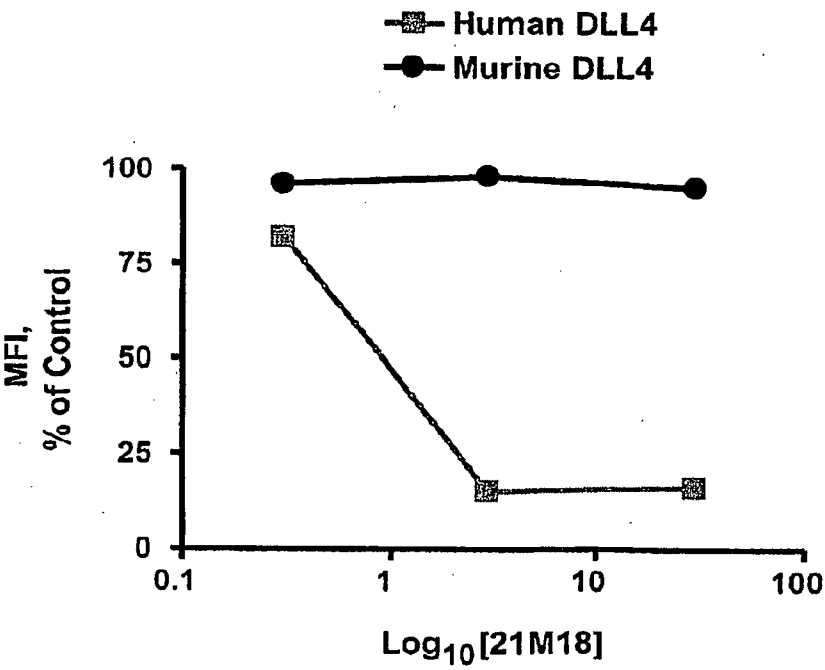
Figure 2

DLL4 Antibodies Block the Interaction of DLL4 with the Human Notch Receptor

A



B

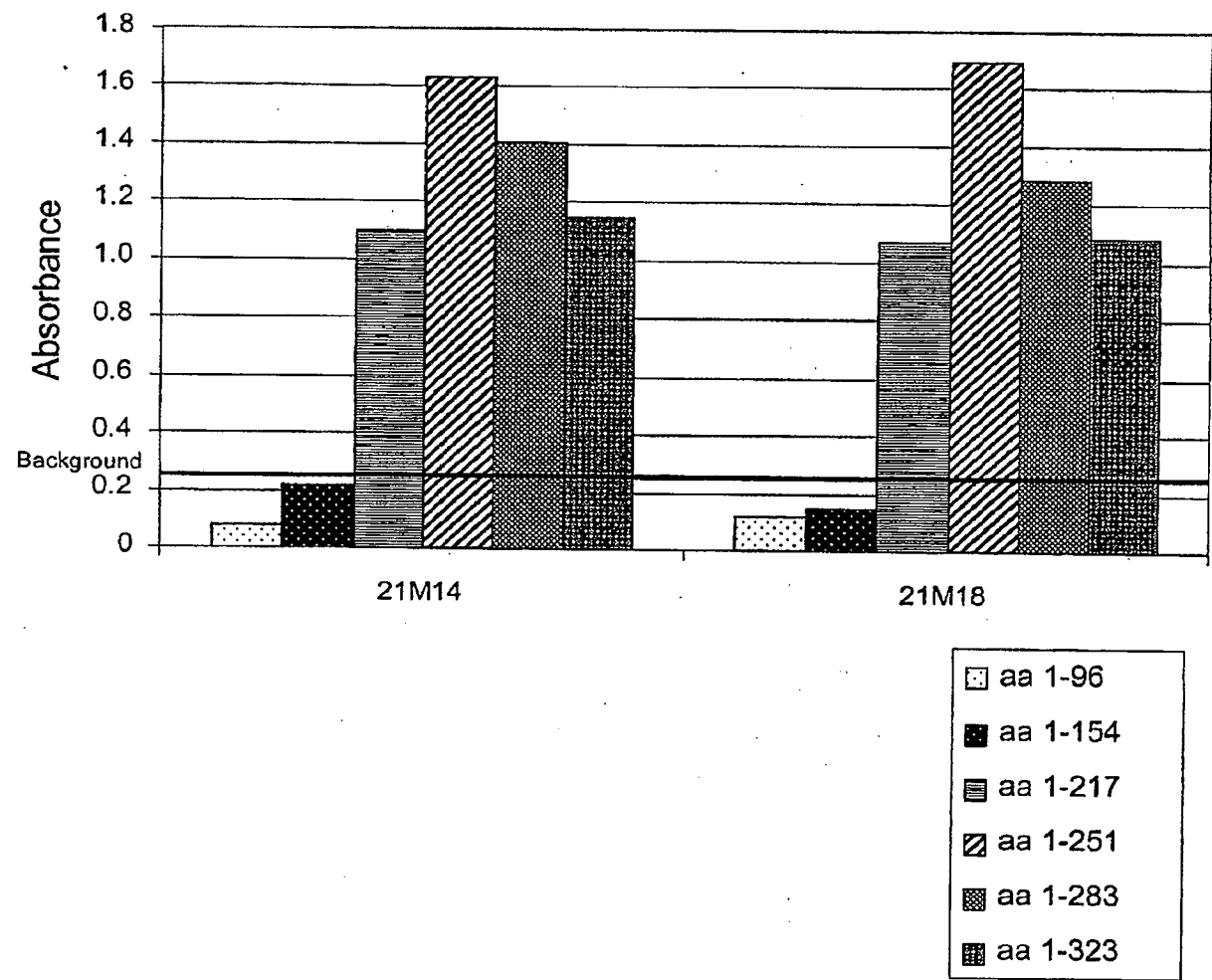


118

Figure 3

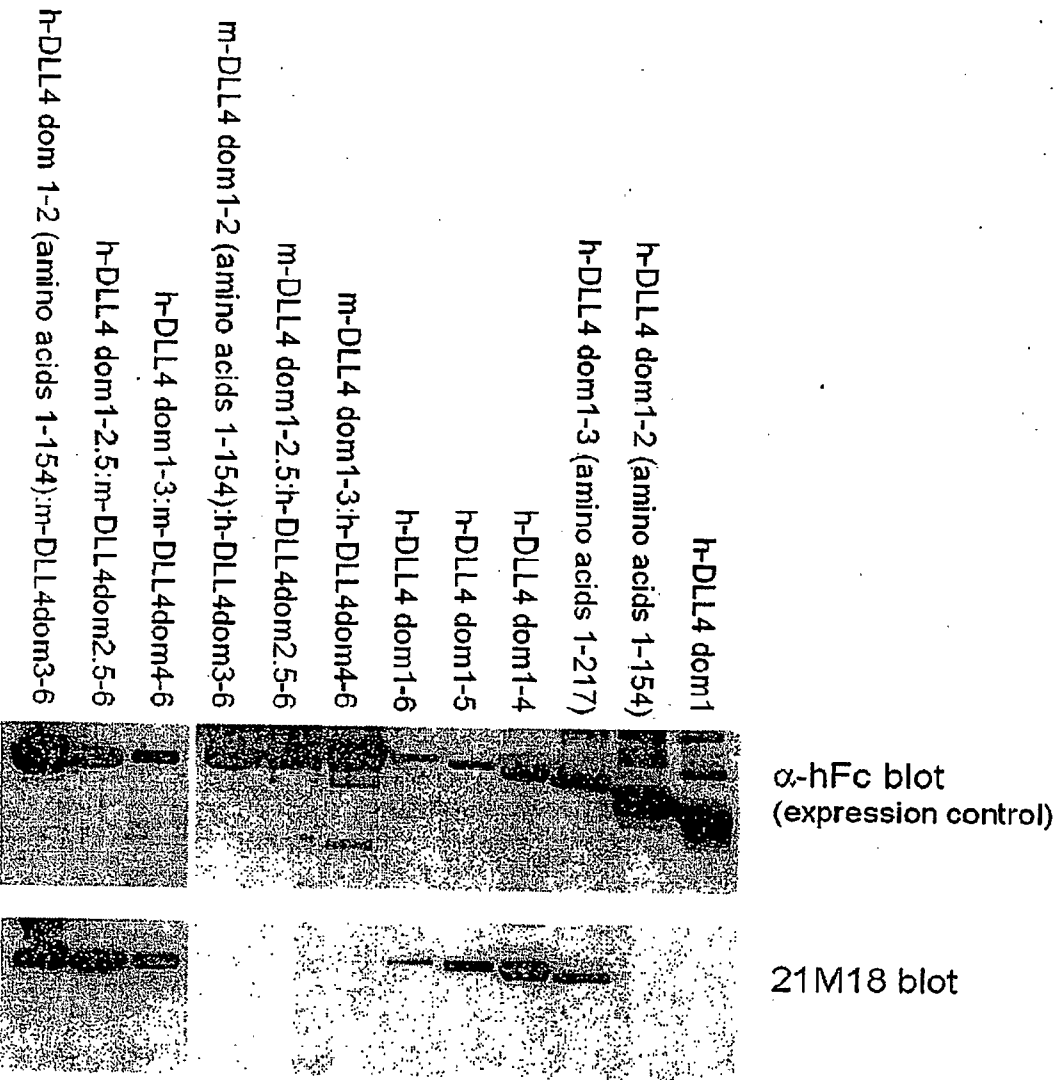
Epitope Mapping of Anti-DLL4 Antibodies

A



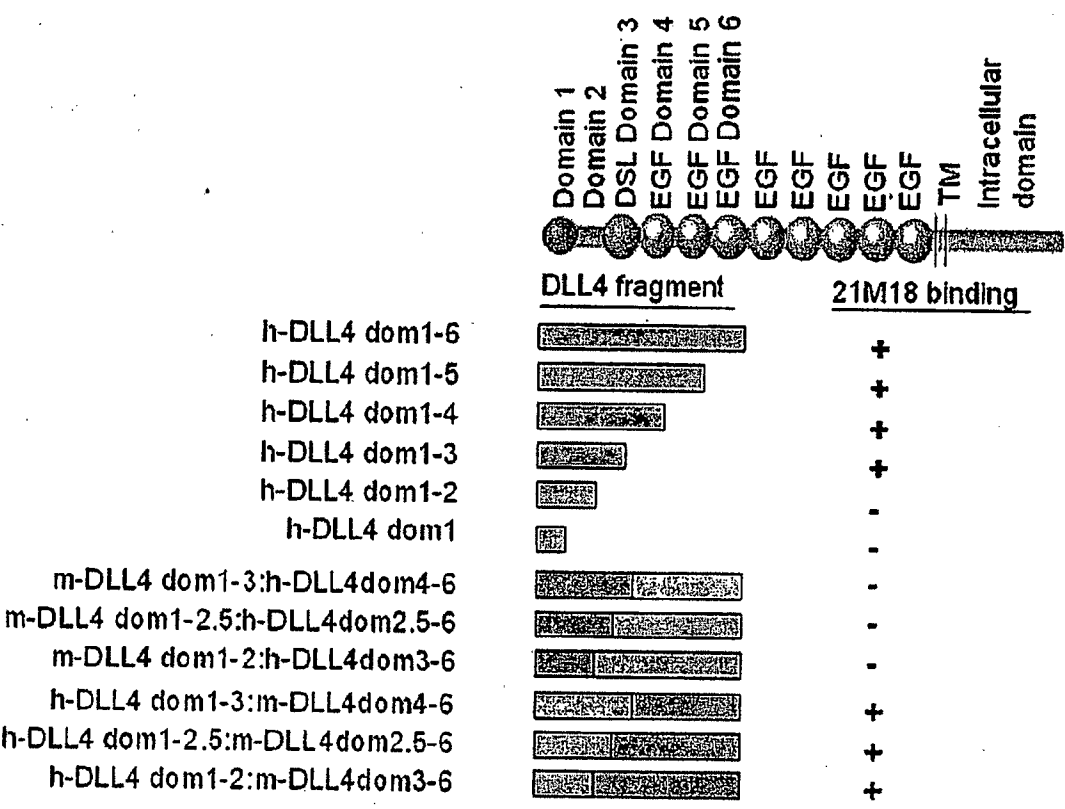
mg

Figure 3B



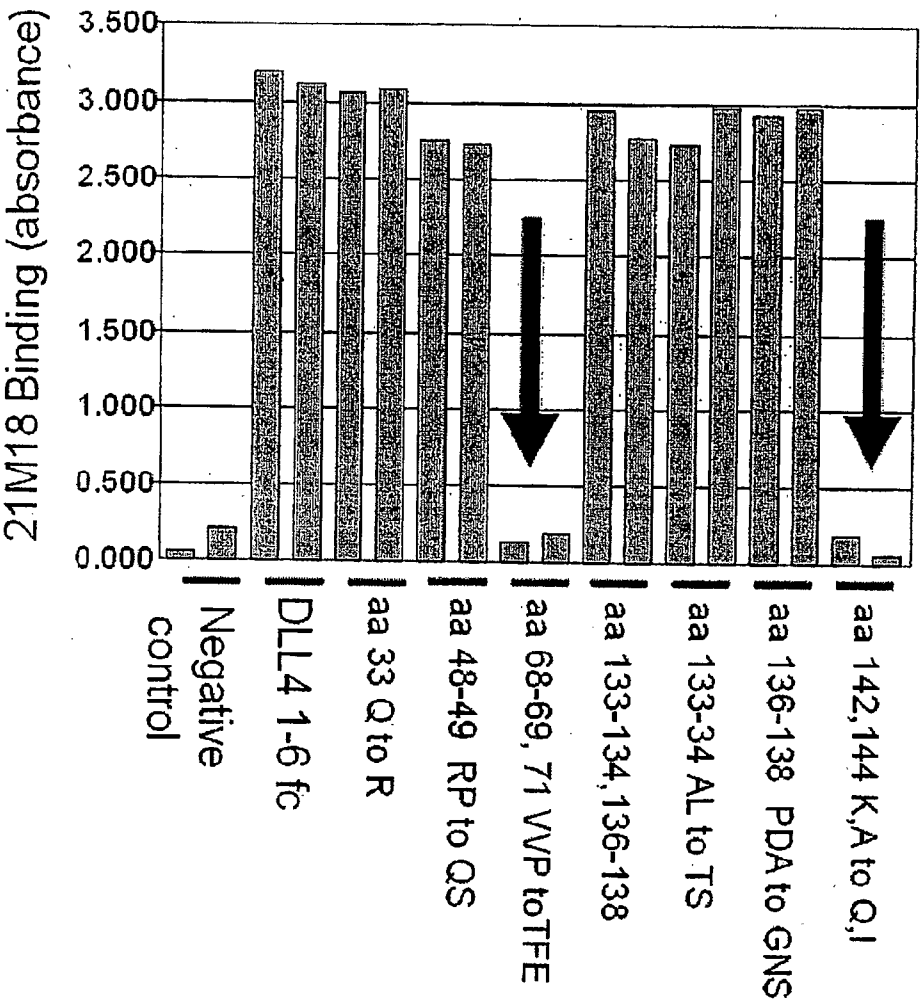
120

Figure 3C



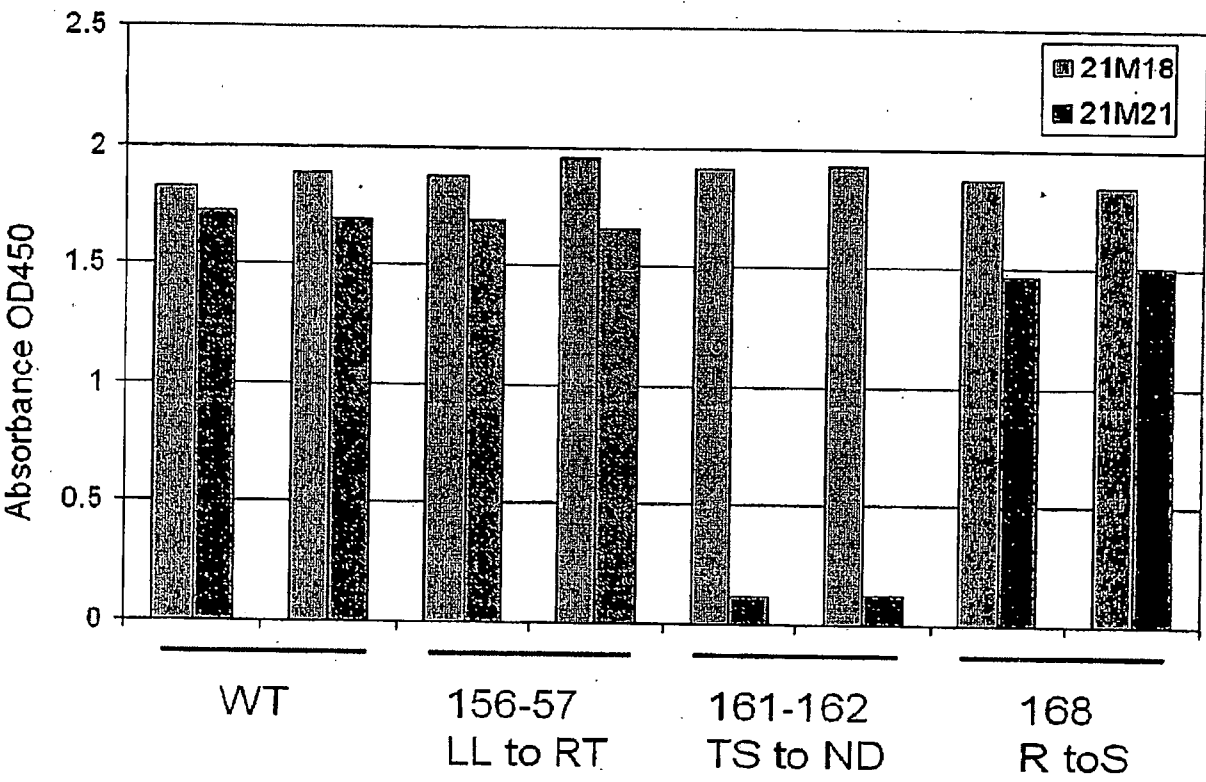
121

Figure 3D



122

Figure 3E



123

Figure 4

Sequence alignment of the heavy chain variable region

4A)

Signal sequence

1 2 3,4 CDR-1 5

m-21M18-Vh
EST-Framework
H7

1 MGWELWIFLEFLHSCTAGVHSEVOLQOSGPBVRKTCASVKISCKASGYSETAYYIHVVKQSH
1 MDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASCGTFTTAYVSNVQAP
1 MDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSETAYYIHVVKQAP

6

CDR-2

m-21M18-Vh
EST-Framework
H7

61 GKSLIEWIGYISCYNGATNYNOKFKGKATFTVDTSSSTAEMQFNLSLSEDEAVYYCARDYD
61 GQGLEWVWGRIIPMLERPNVYOKFQGRVTEFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKXXXK
61 GQGLEWIGYISSYNGATNYNOKFKGRVTEFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD

CDR-3

m-21M18-Vh
EST-Framework
H7

121 YDVGM DYWGQGTSTVTVSS
121 XXXXXXXXWGQGTSTVTVSS
121 YDVGM DYWGQGTSTVTVSS

4B)

Signal sequence

1 2 CDR-1 3

m-21M18-Vh
h-Germline-Vh
21M18-H2

1 MGWELWIFLEFLHSCTAGVHSEVOLQOSGPBVRKTCASVKISCKASGYSETAYYIHVVKQSH
1 MDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIGSNVQAP
1 MDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSETAYYIHVVKQAP

4

CDR-2

5

m-21M18-Vh
h-Germline-Vh
21M18-H2

61 GKSLIEWIGYISCYNGATNYNOKFKGKATFTVDTSSSTAEMQFNLSLSEDEAVYYCARDYD
61 GQGLEWVWGRIISAYNGNTNYOKLQGRVTEFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKXXXK
61 GQGLEWIGYISCYNGATNYNOKFKGRVTEFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD

CDR-3

m-21M18-Vh
h-Germline-Vh
21M18-H2

121 YDVGM DYWGQGTSTVTVSS
121 XXXXXXXXWGQGTSTVTVSS
121 YDVGM DYWGQGTSTVTVSS

Figure 5

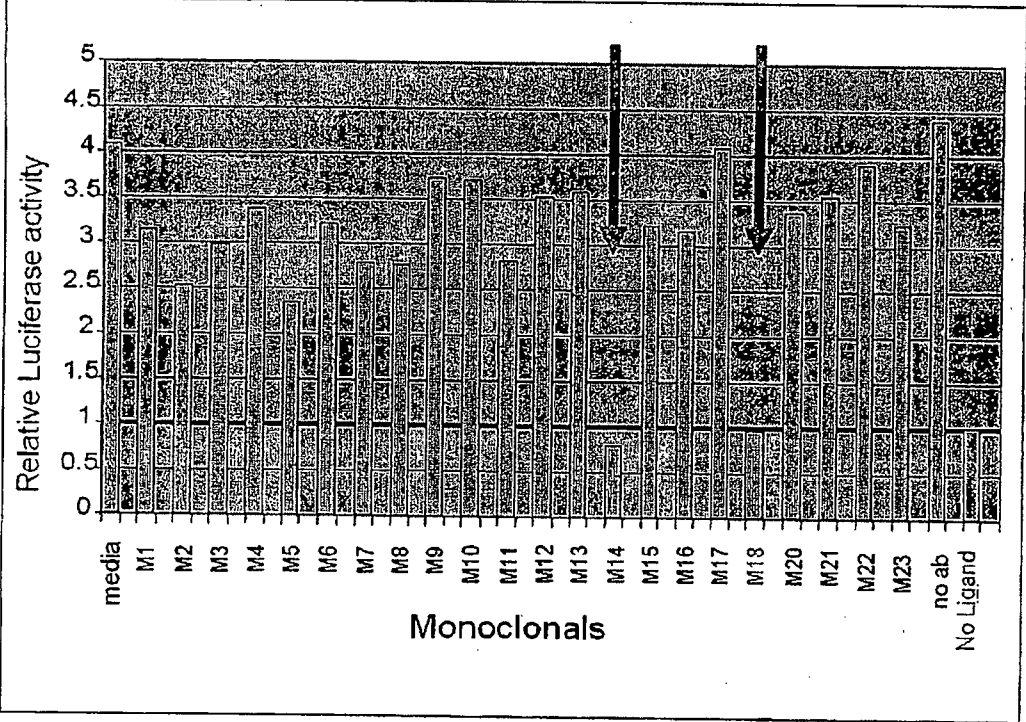
Sequence alignment of the light chain variable region

		Signal sequence	1	CDR-1
m-21M18-Vk	1	MEEDTLTLWVLLWVPGSKGDIVETOSPASLAVSLGORATISCRASEVDN	--	YGISFMK
h-germline-Vk	1	MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTOSPDLSLAVSLGERATIN	CGSSQSVLYSSNNKN	YLA
21M18-L2	1	MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTOSPDLSLAVSLGERATISCRASEVDN	--	YGISFMK
		2	CDR-2	CDR-3
m-21M18-Vk	59	WFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGGVPARFSGSGSGTDFSLNTHPM	EEEDTAM	YFCQOSKEV
h-germline-Vk	61	WFQQKPGQPPKLLIYMASTRISGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOQY	YST	
21M18-L2	59	WFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSKEV		
		CDR-3		
m-21M18-Vk	119	E-WTFGGGTRK	IEIK	
h-germline-Vk	121	EPWTFGGTRK	VEIK	
21M18-L2	119	E-WTFGGGTRK	VEIK	

125

Figure 6

21M14 and 21M18 Block DLL4 Mediated Notch signaling

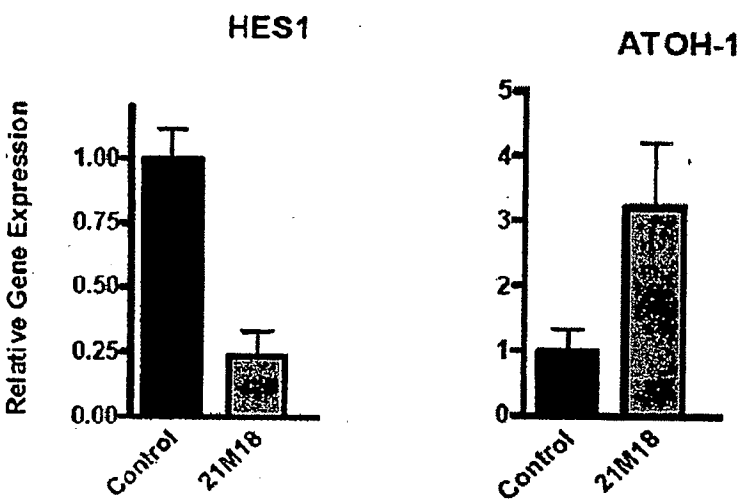


126

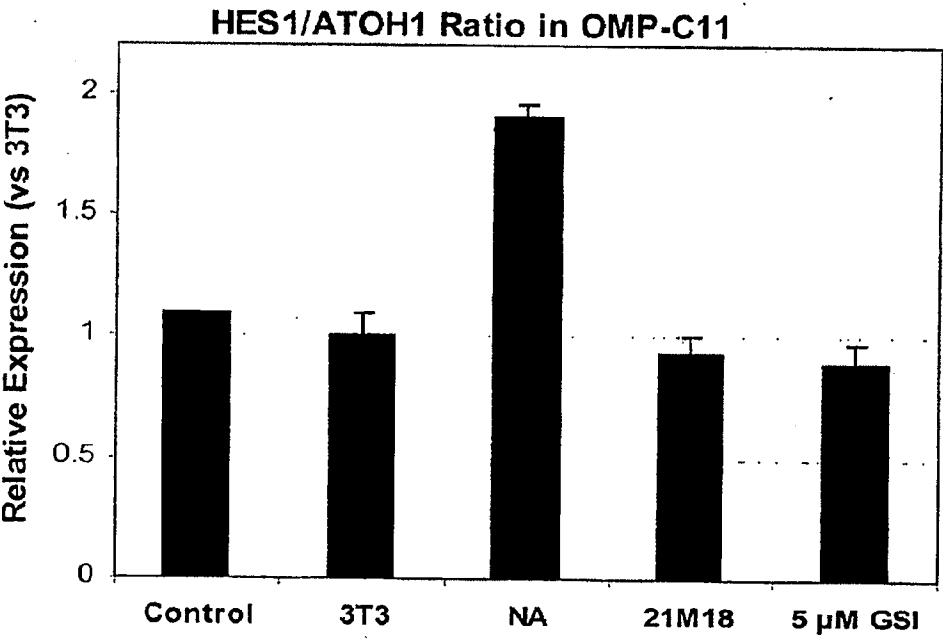
Figure 7

DLL4 Antibodies Modulate Expression of Notch Target Genes in Colon Tumors

A



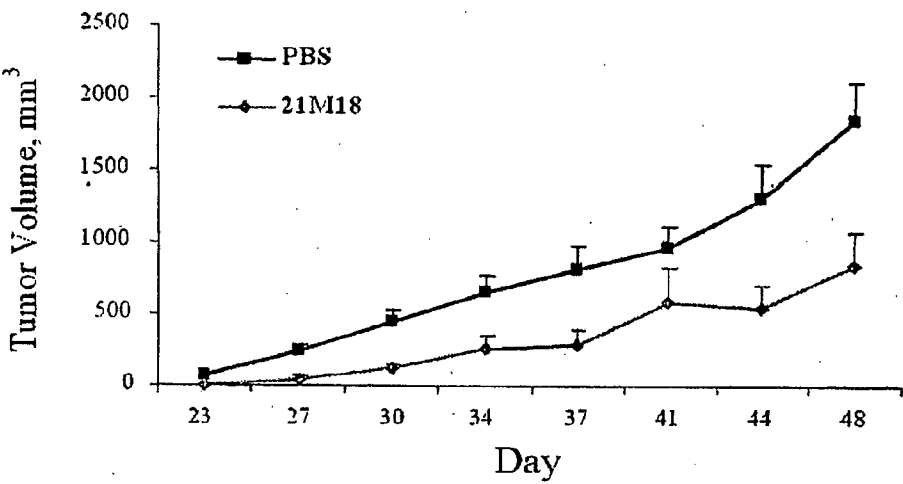
B



1727

Figure 8

21M18 (Anti-DLL4) Reduces UM-C4 Colon Tumor Growth

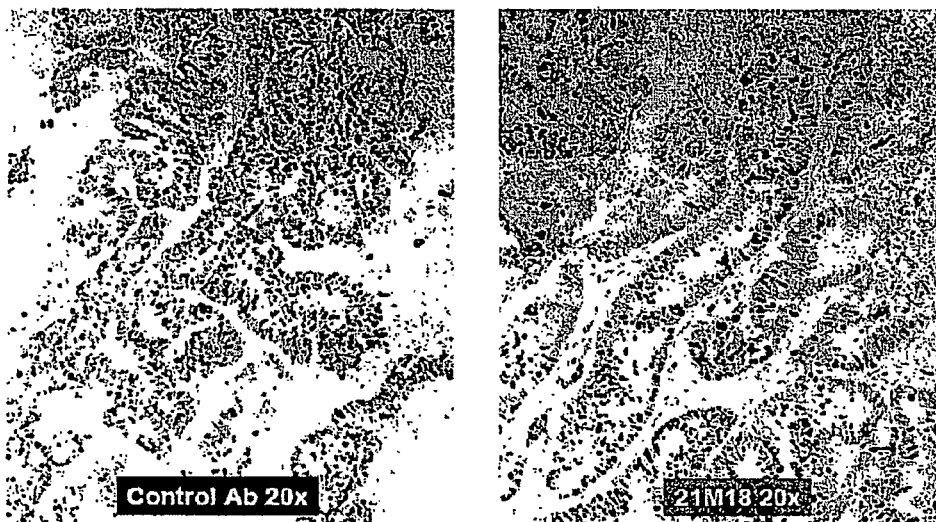


Tumor reduction = 54% p = 0.03

128

Figure 9

**Anti-DLL4 21M18 Antibodies Reduces the Number of
Proliferating Tumor Cells in Vivo**

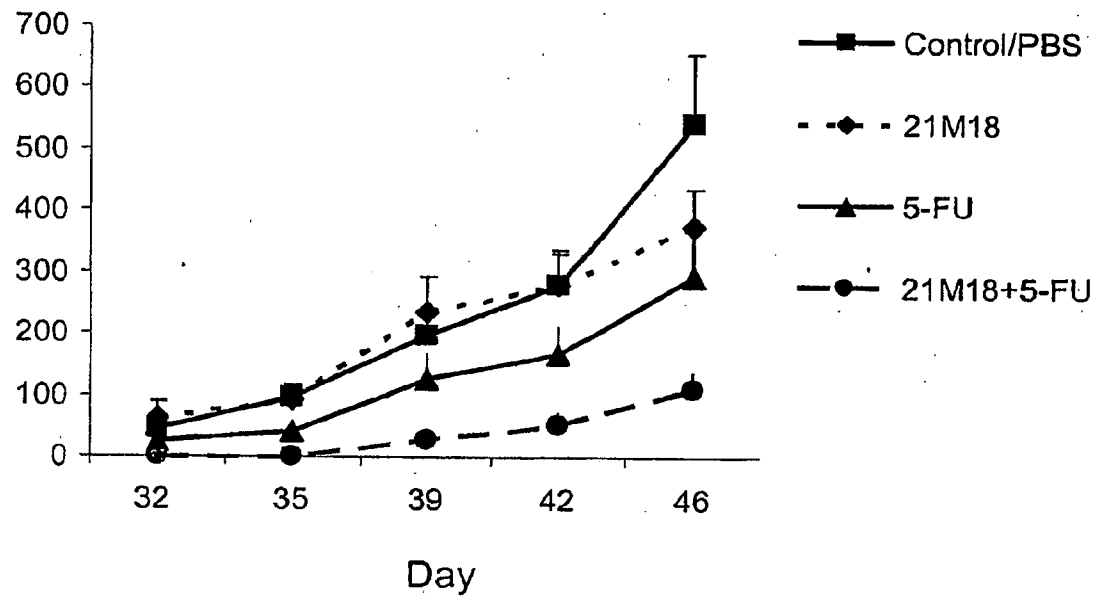


124

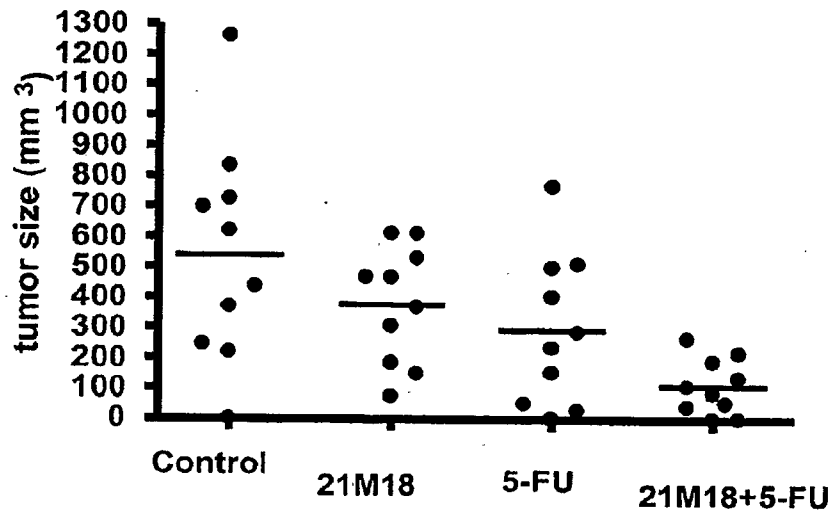
Figure 10

Anti-DLL4 and 5-FU Reduce UM-C4 Colon Tumor Growth

A



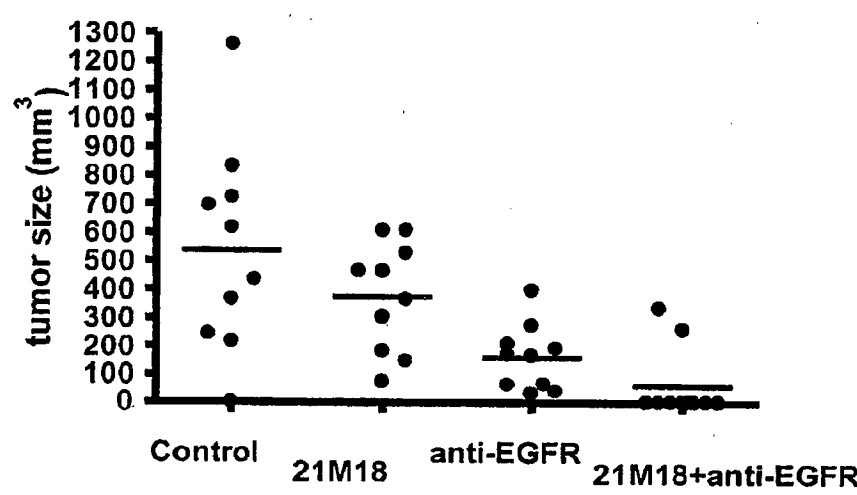
B



130

Figure 11

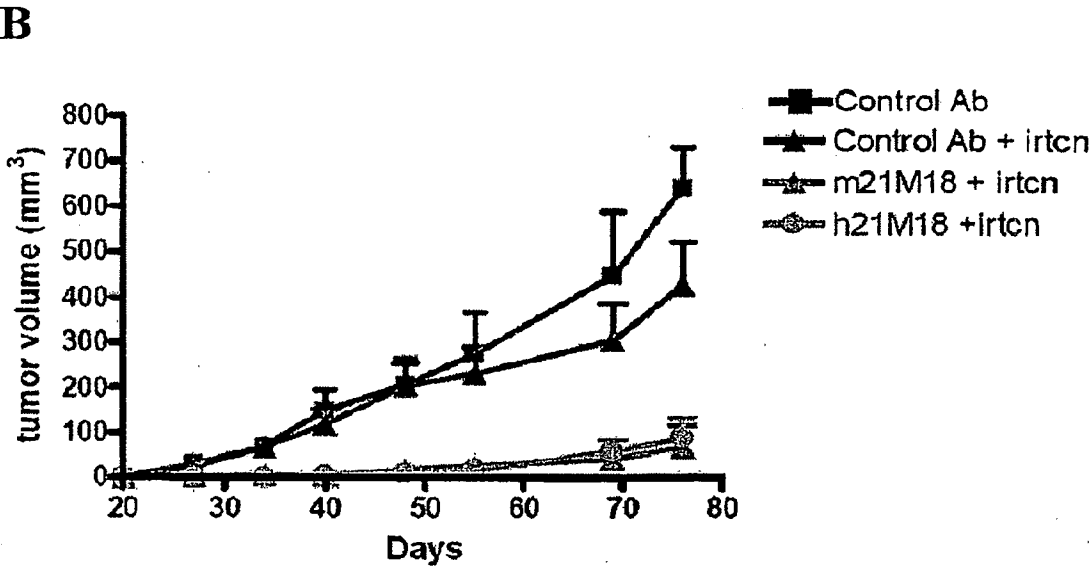
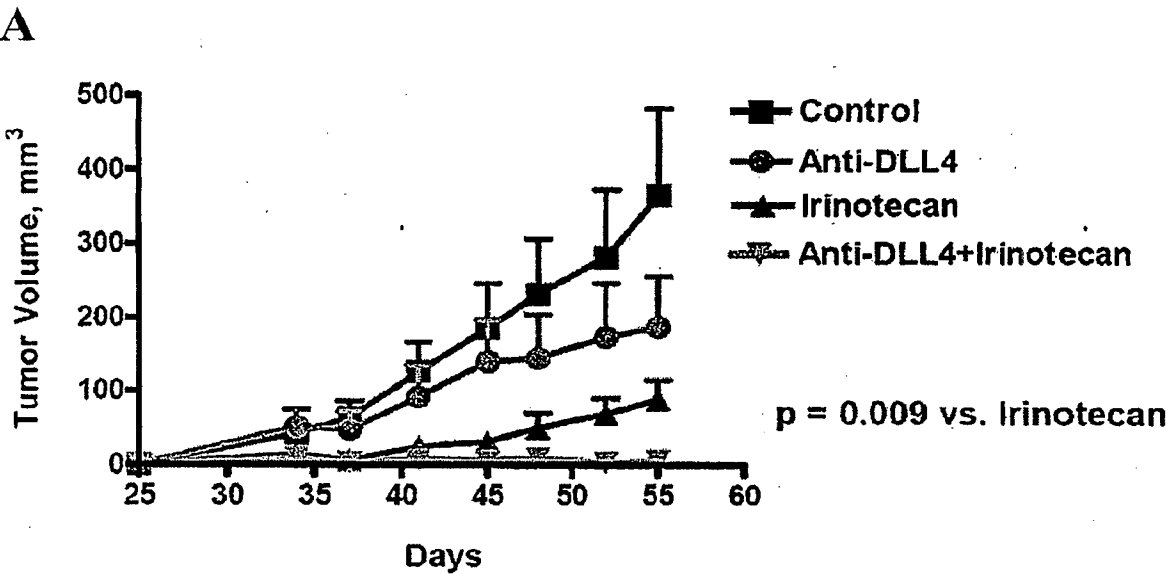
Combination of anti-DLL4 and anti-EGFR Inhibits UM-C4
Tumor Growth



131

Figure 12

Anti-DLL4 mAb 21M18 and Irinotecan Act Synergistically to Inhibit Colon Tumor Growth



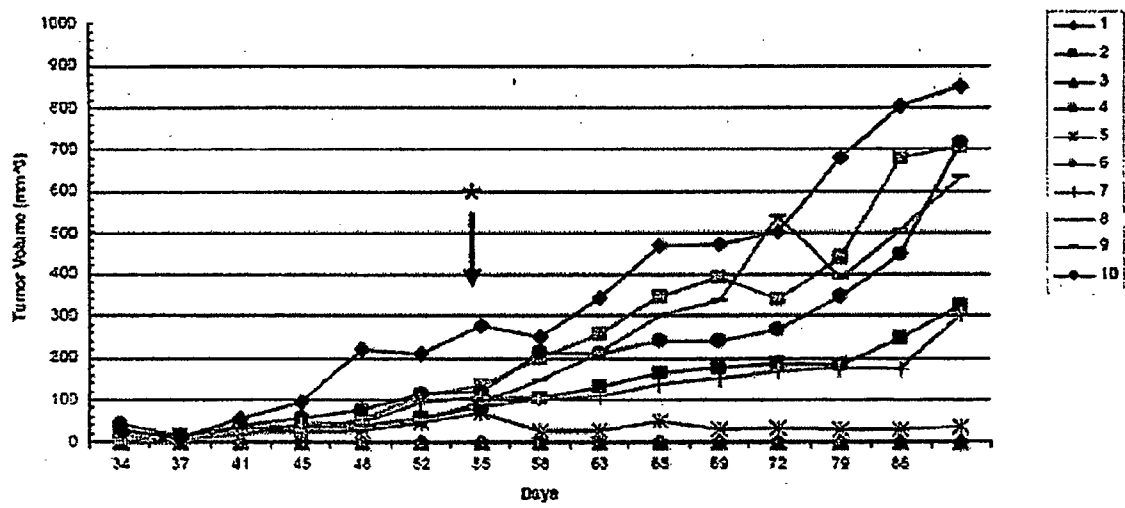
132

Figure 13

Combination Anti-DLL4 mAb 21M18 and Irinotecan Treatment Prevents Colon Tumor Re-Growth

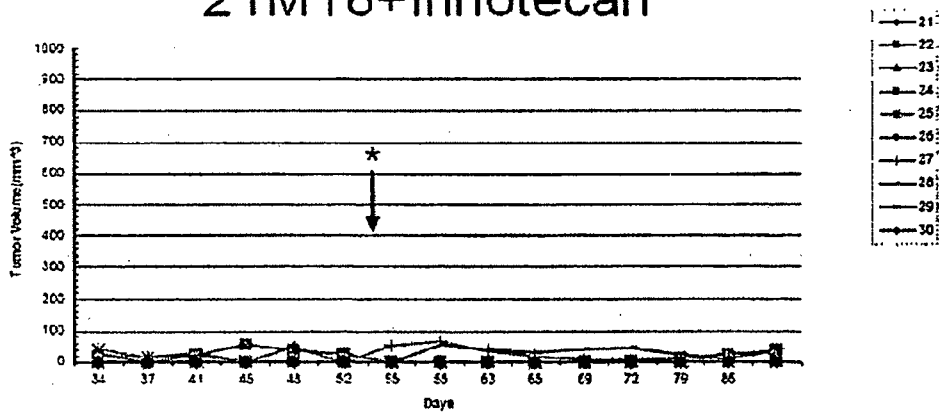
A

Irinotecan



B

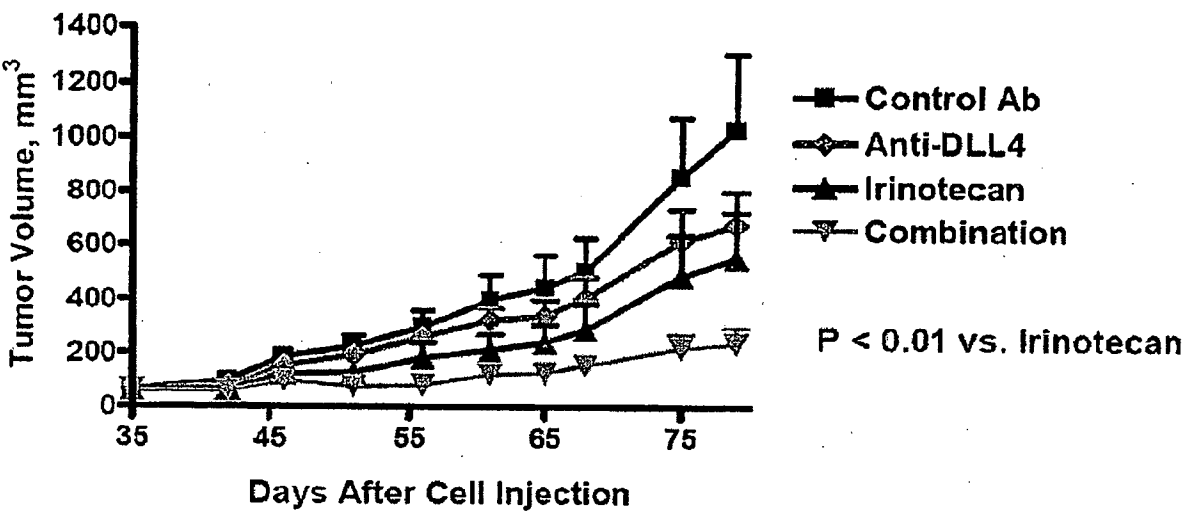
21M18+Irinotecan



133

Figure 14

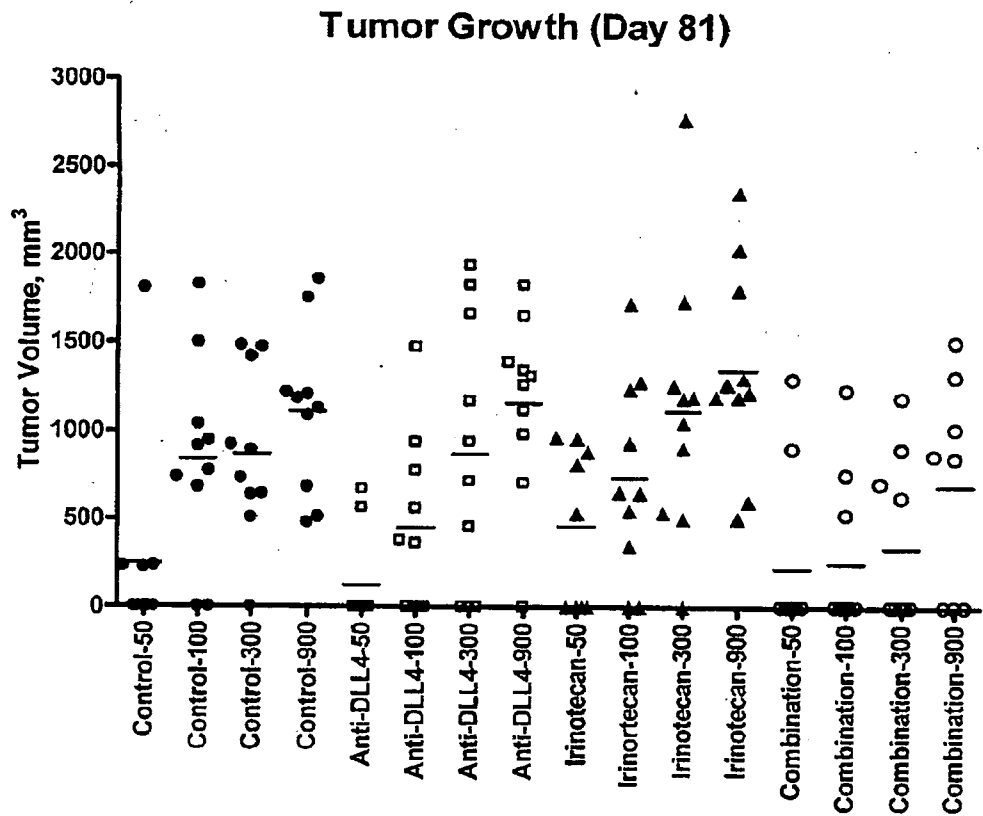
**Combination Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Treatment
Inhibits Growth of Established Colon Tumors More Effectively
than Single Therapy Treatment**



134

Figure 15A

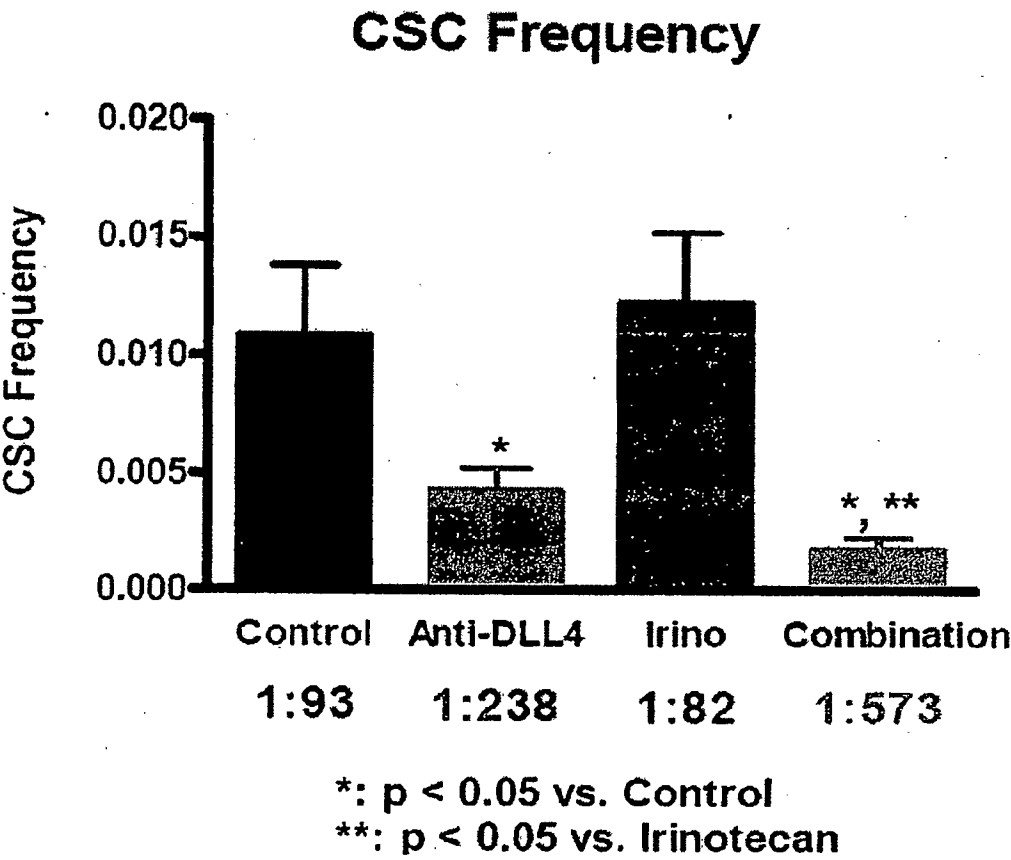
Combination Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Treatment
Reduces Cancer Stem Cell Frequency



135

Figure 15B

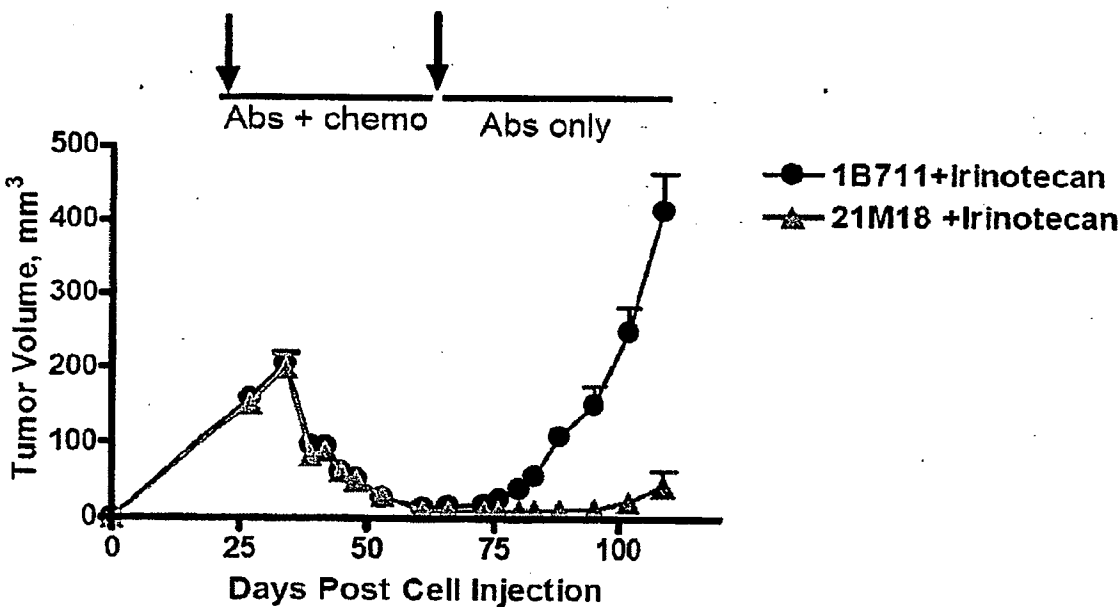
**Combination Anti-DLL4 21M18 and Irinotecan Treatment
Reduces Cancer Stem Cell Frequency**



Handwritten signature or initials.

Figure 16

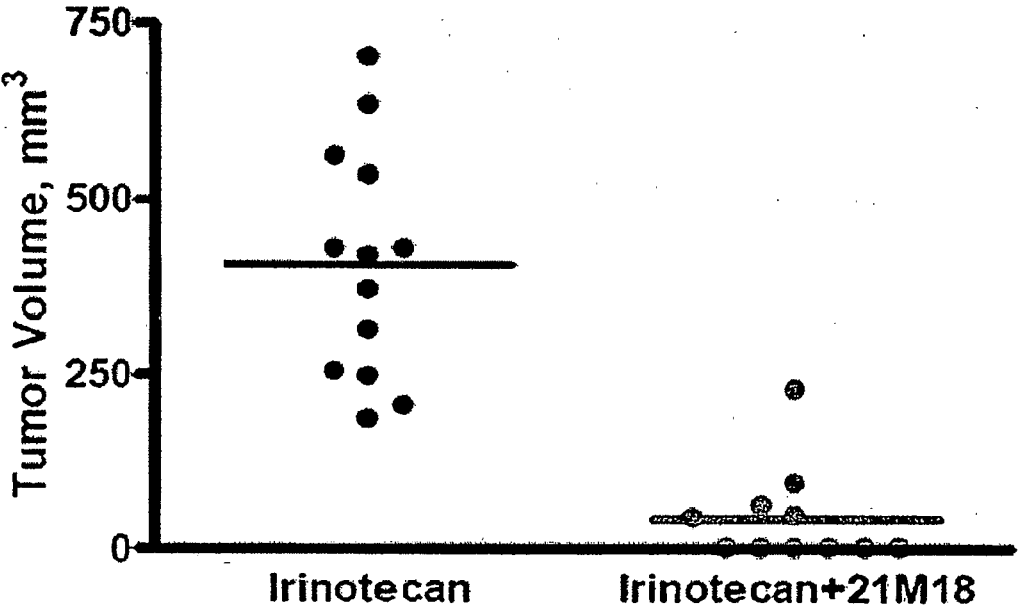
Anti-DLL4 21M18 Treatment Delays Tumor Recurrence after
DLL-4 and Irinotecan Combination Treatment



13X

Figure 17

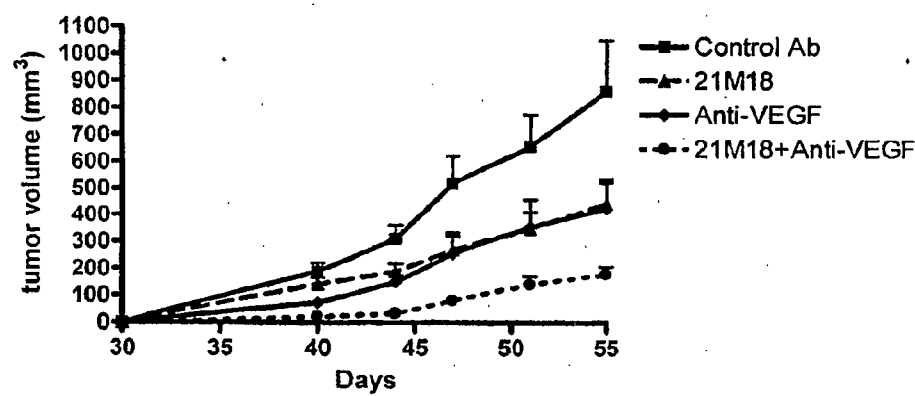
Combination Anti-DLL4 21M18-Irinotecan Treatment Reduces Tumor Volume 47 Days After Treatment Termination



138

Figure 18

21M18 and Anti-VEGF Inhibit Colon Tumor Growth



139

SEQ ID NO: 1 (Heavy chain CDR1)

TAYYIH

SEQ ID NO: 2 (Heavy chain CDR2, H2)

YISCYNGATNYNQKFKG

SEQ ID NO: 3 (Heavy chain CDR2 H7)

YISSYNGATNYNQKFKG

SEQ ID NO: 4 (Heavy chain CDR2 H9)

YISVYNGATNYNQKFKG

SEQ ID NO: 5 (Heavy chain CDR3)

RDYDYDVGM DY

SEQ ID NO: 6 (Heavy chain variable region, H2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYI SCYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 7 (Heavy chain variable region, H7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 8 (Heavy chain variable region, H9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISVYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 9 (Light chain CDR1)

RASESVDNYGISFMK

SEQ ID NO: 10 (Light chain CDR2)

AASNQGS

SEQ ID NO: 11 (Light chain CDR3)

QQSKEVPWTFGG

SEQ ID NO: 12 (Light chain variable region)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIK

SEQ ID NO: 13 (Nucleotide sequence of heavy chain, H2, variable region)

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTGTTCTGCTGGTGGCTGCTGCTACAGGAGCTCACTCCCAGGTT CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTAGCGGATACTCCTTTACAGCT

740

TACTACATCCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATCGGATATATCAGCTGTTACAACGGA
GCTACAAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCTTCACAACAGACACAAGCACAAGCACAGCCTACATG
GAGCTGAGGAGCCTGAGAAGCGACGACACAGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGACTACGACTACGACGTGGGGATG
GACTACTGGGGCCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 14 (Nucleotide sequence of heavy chain, H7, variable region)

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTGTTCCCTGGTGGCTGCTGCTACAGGAGCTCACTCCCAGGTTTCACTGGTGCAG
TCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTAGCGGATACTCCTTTACAGCT
TACTACATCCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATCGGATATATCAGCTCCTACAACGGA
GCTACAAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCTTCACAACAGACACAAGCACAAGCACAGCCTACATG
GAGCTGAGGAGCCTGAGAAGCGACGACACAGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGACTACGACTACGACGTGGGGATG
GACTACTGGGGCCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 15 (Nucleotide sequence of heavy chain, H9)

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTGTTCCCTGGTGGCTGCTGCTACAGGAGCTCACTCCCAGGTTTCACTGGTGCAG
TCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTAGCGGATACTCCTTTACAGCT
TACTACATCCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATCGGATATATCAGCTCCTACAACGGA
GCTACAAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCTTCACAACAGACACAAGCACAAGCACAGCCTACATG
GAGCTGAGGAGCCTGAGAAGCGACGACACAGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGACTACGACTACGACGTGGGGATG
GACTACTGGGGCCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 16 (Nucleotide sequence of light chain)

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGGGACATCGTGATGACC
CAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGAT
AATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTCCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACGCTGCA
TCCAACCAAGGGTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTGCAAGCAAGGAGGTGCCTTGGACATTCCGAGGAGGG
ACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCCCTCCGTCTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAA
AGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCCGGGAGGCAAGTGCAGTGGAAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAAAGCGGCAACTCCCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTG
AGCAGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTTGA

SEQ ID NO: 17 (Nucleotide sequence of heavy chain CDR1)

ACAGCTTACTACATCCAC

SEQ ID NO: 18 (Nucleotide sequence of heavy chain CDR2, H2)

ATATCAGCTGTTACAACGGAGCTACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC

SEQ ID NO: 19 (Nucleotide sequence of heavy chain CDR2, H7)

ATATCAGCTCCTACAACGGAGCTACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC

SEQ ID NO: 20 (Nucleotide sequence of heavy chain CDR2, H9)

ATATCAGCGTCTACAACGGAGCTACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC

1421

SEQ ID NO: 21 (Nucleotide sequence of heavy chain CDR3)

AGGGACTACGACTACGACGTGGGGATGGACTAC

SEQ ID NO: 22 (Nucleotide sequence of light chain CDR1)

AGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAG

SEQ ID NO: 23 (Nucleotide sequence of light chain CDR2)

GCTGCATCCAACCAAGGGTCC

SEQ ID NO: 24 (Nucleotide sequence of light chain CDR3)

CAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGGACATTCGGAGGA

SEQ ID NO: 25 (Human DLL4 Antigen)

MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQA
VVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPD
ALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGN
LSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCD
EGWGGFLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQORSYTCTCRPGYTGVDCLELSECDNPCRNGGSCK
DQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTS
NPCANGGQCLNRGPRMCRCPGFTGTYCELVSDCARNPCAHHGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRC
EVRTSIDACASSPCFNCRATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFFVG

SEQ ID NO: 26 (Human DLL4 DSL Domain)

WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC

SEQ ID NO: 27 (Human DLL4 N-Terminal Region)

MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQA
VVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPD
ALISKIAIQGSLAVGQN

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

(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA
PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

OMP
PCT



(43) Fecha de Publicación Internacional:
10 de Abril de 2008 (10.04.2008)

(10) Número de Publicación Internacional:
WO 2008/042236 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁷:

C07K 16/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
C07K 21/08 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2007/020889

(22) Fecha de Presentación Internacional:
29 de Septiembre de 2007 (29.09.2007)

(25) Idioma Presentado: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Fecha de Prioridad:

60/847,904 29 de Septiembre de 2006 (29.09.2006) US
60/886,260 23 de Enero de 2007 (23.01.2007) US
60/942,542 07 de Junio de 2007 (07.06.2007) US

(71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto US):
ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 800
Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) Inventor: e

(75) Inventor/Solicitante: (para US únicamente): **GURNEY**,
Austin [US/US]; 496 Diamond Street, San Francisco, CA
94114 (US). **HOEY, Timothy** [US/US]; 200 Darrell Road,
Hillsborough CA 94010 (US). **SATYAL, Sanjeev** [IN/US];
965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (US).
AXELROD, Fumiko [US/US]; 3780 Wright Place, Palo
Alto, CA 94306 (US).

(74) Agente: **MCCABE, Kevin, W.** et al; Sterne, Kessler,
Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W.,
Washington, DC 20005-3934 (US).

(81) Estados Designados: (a menos que se indique de otro
modo, para cada caso de protección nacional
disponible): 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) Estados Designados: (a menos que se indique de otro
modo, para cada caso de protección regional
disponible): patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), patente Europea (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), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicada:

- con el reporte de búsqueda internacional
- con indicaciones con relación al depósito de material
biológico proporciona de acuerdo con la Regla 13bis de
forma separada de la descripción
- con parte del listado de secuencias de la descripción
publicada se manera separada en forma electrónica y
disponible a petición de la Oficina Internacional

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda
internacional: 31 de Julio de 2008

(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR CÁNCER

(57) Resumen:

Se describe un anticuerpo aislado que se une de manera específica a un dominio extracelular de DLL4 humano y afecta el
crecimiento de un tumor que comprende células madre de cáncer. También se describe un método para tratar cáncer que comprende
administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-DLL4.

WO 2008/042236 A3

1123

COMPOSICIONES Y METODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR CANCER**Campo de la Invención**

La presente invención se refiere al campo de la
5 oncología y proporciona nuevas composiciones y métodos para
diagnosticar y tratar cáncer. La presente invención
proporciona anticuerpos contra un marcador de células madre de
cáncer para la diagnosis y tratamiento de tumores sólidos.

Antecedentes de la Invención

10 El cáncer es una de las causas principales de muerte
en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas
diagnosticadas con cáncer y 500,000 muertes por año sólo en
los Estados Unidos de América. En conjunto se estima que más
de 1 de 3 personas desarrollará alguna forma de cáncer durante
15 su vida. Hay más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro
de los cuales, de mama, de pulmón, colorrectal y de próstata,
dan cuenta de más de la mitad de todos los nuevos casos (Jemal
et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

El cáncer de mama es el cáncer más común en las
20 mujeres, con un 12 % estimado de mujeres en riesgo de
desarrollar la enfermedad durante su vida. Aunque las
proporciones de mortalidad han disminuido debido a detección
temprana y tratamientos mejorados, el cáncer de mama permanece
como una causa principal de muerte en mujeres de edad
25 intermedia, y el cáncer metastásico de mama es aún una

144

enfermedad incurable. En la presentación, la mayoría de los pacientes con cáncer metastásico de mama sólo tienen uno o dos sistemas de órganos afectados, pero conforme progresa la enfermedad, usualmente se llegan a comprender múltiples sitios. Los sitios más comunes de implicación metastásica son reincidencias locorregionales y tejidos blandos de la pared torácica, así como en la axila y áreas supraclaviculares. El sitio más común para metástasis distante es el hueso (30-40 % de metástasis distante), seguido por los pulmones e hígado. Y aunque sólo aproximadamente 1-5 % de las mujeres con cáncer de mama recién diagnosticado tienen metástasis distante en el momento de la diagnosis, aproximadamente el 50 % de los pacientes con enfermedad local recaen eventualmente con metástasis en el espacio de cinco años. En la actualidad, la supervivencia media a partir de la manifestación de la metástasis distante es aproximadamente tres años.

Los métodos actuales de diagnosis y clasificación en etapas del cáncer de mama incluyen el sistema de tumor-nódulo-metástasis (TNM) que depende del tamaño del tumor, de la presencia del tumor en los nódulos linfáticos, y de la presencia de metástasis distancia (American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual, Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5th ed., 1997, pp 171-180; Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" en Harris, J. R., Hellman, S.; Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast

MS

Diseases, Philadelphia, Lippincott, 1991). Se usan estos parámetros para proporcionar una prognosis y para seleccionar una terapia apropiada. La apariencia morfológica del tumor también se puede valorar pero debido a que tumores con
5 apariencia histopatológica similar pueden exhibir variabilidad clínica significativa, este planteamiento tiene serias limitaciones. Finalmente, se pueden usar ensayos para marcadores de superficie celular para dividir ciertos tipos de tumores en sub-clases. Por ejemplo, un factor considerado en
10 la prognosis y en el tratamiento del cáncer de mama es la presencia del receptor de estrógeno (ER) puesto que los canceres de mama positivos a ER responden típicamente de forma más fácil a terapias hormonales tal como tamoxifeno o inhibidores de aromatasa que los tumores negativos a ER. Aún
15 estos análisis, aunque útiles, son sólo parcialmente predictivos del comportamiento clínico de los tumores de mama, y hay mucha diversidad fenotípica presente en los canceres de mama que fallan en detectar las herramientas actuales de diagnóstico y fallan en tratar las terapias actuales.

20 El cáncer de próstata es el cáncer más común en los hombres en el mundo desarrollado, que representa un 33 % estimado de todos los nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos de América y es la segunda causa más frecuente de muerte (Jemal et al., 2003, *CA Cancer J. Clin.* 53:5-26).
25 Desde la introducción de la prueba sanguínea de antígeno

126

específico a próstata (PSA), la detección temprana de cáncer de próstata ha mejorado dramáticamente las proporciones de supervivencia; la proporción de supervivencia de cinco años para pacientes con cánceres de próstata en etapa local y regional en el momento de la diagnosis es cercana a 100 %. Aún más de 50 % de los pacientes desarrollarán enfermedad localmente avanzada o metastásica (Muthuramalingam et al., 2004, *Clin. Oncol.* 16:505-16)

Actualmente, la prostatectomía radical y la terapia con radiación proporcionan tratamiento curativo para la mayoría de los tumores localizados de próstata. Sin embargo, las opciones terapéuticas están muy limitadas para los casos avanzados. Para la enfermedad metastásica, el tratamiento normal es la ablación de andrógenos con agonista de la hormona de liberación de la hormona luteinizante (LHRH), solo o en combinación con anti-andrógenos. Aún a pesar del bloqueo máximo de andrógenos, la enfermedad casi siempre progresa con la mayoría que desarrolle enfermedad independiente de andrógenos. En la actualidad, no hay tratamiento uniformemente aceptado para cáncer de próstata refractario a hormonas, y comúnmente se usan regímenes quimioterapéuticos (Muthuramalingam et al., 2004, *Clin. Oncol.* 16:505-16; Trojan et al., 2005, *Anticancer Res.* 25:551-61).

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común y la cuarta causa más frecuente de muertes por cáncer a nivel

149

mundial (Weitz et al., 2005, *Lancet* 365:153-65).

Aproximadamente 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios con una de las formas principales que es poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad dominante autosomal en la cual aproximadamente el 80 % de los individuos afectados contienen una mutación de línea germinal en el gen de poliposis coli adenomatosa (APC). Los carcinomas colorrectales invaden localmente por crecimiento circunferencial y en otro sitio por propagación linfática, hematogénica, transperitoneal y perineural. El sitio más común de implicación extralinfática es el hígado, con los pulmones que es el órgano extra-abdominal más frecuentemente afectado. Otros sitios de propagación hematogénica incluyen los huesos, riñones, glándulas suprarrenales, y el cerebro.

El actual sistema de clasificación en etapas para cáncer colorrectal se basa en el grado de penetración tumoral a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de implicación nodal. Este sistema de clasificación en etapa se define por tres principales clasificaciones de Duke: enfermedad A de Duke se confina a capas submucosas de colon o recto; enfermedad B de Duke tiene tumores que invaden a través de la muscularis propia y pueden penetrar la pared del colon o recto; y la enfermedad C de Duke incluye cualquier grado de invasión de la pared intestinal con metástasis regional de los nódulos linfáticos. En tanto que la resección quirúrgica es

148

altamente efectiva para cánceres colorrectales de etapa temprana, que proporciona proporciones de curación de 95 % en pacientes con A de Duke, la proporción se reduce a 75 % en pacientes con B de Duke y la presencia del nódulo linfático positivo en la enfermedad C de Duke predice una probabilidad del 60 % de reincidencia en el espacio de cinco años. El tratamiento de los pacientes con C de Duke con un curso quirúrgico de quimioterapia reduce la proporción de reincidencia a 40-50 % y ahora es la norma de cuidado para estos pacientes.

El cáncer de pulmón es el cáncer más común a nivel mundial, el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado en los Estados Unidos de América, y por mucho la causa más frecuente de muerte por cáncer (Spiro et al., 2002, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-96; Jemal et al., 2003, *CA Cancer J. Clin.* 53:5-26). Se cree que el fumar cigarrillos es responsable de un 87 % estimado de todos los cánceres de pulmón haciéndolo la enfermedad más mortalmente prevenible. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales que dan cuenta de más de 90 % de todos los cánceres de pulmón: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). El SCLC da cuenta de 15-20 % de los casos y se caracteriza por su origen en las vías aéreas centrales grandes y composición histológica de laminillas de células pequeñas con poco

mp

citoplasma. El SCLC es más agresivo que el NSCLC, creciendo rápidamente y metastatizándose de forma temprana. El NSCLC da cuenta de 80-85 % de todos los casos y se divide adicionalmente en tres subtipos principales en base a la histología: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), y carcinoma indiferenciado de células grandes.

El cáncer de pulmón se presenta típicamente tardío en su curso, y de esta manera tiene una supervivencia media de sólo 6-12 meses después de la diagnosis y una proporción total de supervivencia de 5 años de sólo 5-10 %. Aunque la cirugía ofrece la mejor probabilidad de una curación, sólo una pequeña fracción de los pacientes con cáncer de pulmón son elegibles con la mayoría que dependen de la quimioterapia y de la radioterapia. A pesar de los intentos para manipular la sincronización e intensidad de dosis de estas terapias, las proporciones de supervivencia se han incrementado poco durante los últimos 15 años (Spiro et al., 2002, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:1166-96).

Estos cuatro canceres, así como muchos otros, se presentan como tumores sólidos que se componen de poblaciones de células heterogéneas. Por ejemplo, los canceres de mama son una mezcla de células de cáncer y células normales, incluyendo células mesenquimales (estromales), células inflamatorias y células endoteliales). Varios modelos de

cáncer proporcionan diferentes explicaciones de la presencia de esta heterogeneidad. Un modelo, el modelo clásico de cáncer, sostiene que las poblaciones de células de cáncer fenotípicamente distintas tienen todas, la capacidad de proliferar y dar lugar a un nuevo tumor. En el modelo clásico, la heterogeneidad de las células tumorales resulta de factores ambientales así como de mutaciones corrientes dentro de las células de cáncer que dan por resultado una población diversa en células tumorigénicas. Este modelo se apoya en la idea que todas las poblaciones de células tumorales tienen algún grado de potencial tumorigénico. (Pandis et al., 1998, *Genes, Chromosomes & Cancer* 12:122-129; Kuukasjrvi et al., 1997, *Cancer Res.* 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, *Cancer* 71:382-391; Bonsing et al., 2000, *Genes Chromosomes & Cancer* 82: 173-183; Beerman H et al., 1991, *Cytometry* 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, *Analyt. Cell. Path.* 19:53; Shen L et al., 2000, *Cancer Res.* 60:3884).

Un modelo alternativo para la heterogeneidad observada de las células tumorales solidas se deriva del impacto de las células madre en el desarrollo tumoral. De acuerdo a este modelo, el cáncer surge de la desregulación de los mecanismos que controlan el desarrollo y mantenimiento normal del tejido. (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324). Durante el desarrollo normal del animal, las células de la mayoría o de todos los tejidos se derivan de precursores

151

normales, llamados células madre (Morrison et al., 1997, *Cell* 88:287-98; Morrison et al., 1997, *Curr. Opin. Immunol.* 9:216-21; Morrison et al., 1995, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35-71). Estas células madre son células que: (1) tienen

5 capacidad proliferativa extensiva; 2) son capaces de división celular asimétrica para generar una o mas clases de progenie con potencial proliferativo y/o evolucionista reducido; y 3) son capaces de divisiones celulares simétricas para auto-renovación o auto-mantenimiento. El ejemplo mejor estudiado

10 de renovación de células adultas por la diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético donde los precursores evolucionistamente inmaduros (células progenitoras y madre hematopoyéticas) responden a señales moleculares para formar tipos variados de células linfoides y sanguíneas.

15 Otras células, incluyendo células del intestino, sistema ductal de mama, y piel se reabastecen constantemente de una pequeña población de células madre en cada tejido, y estudios recientes sugieren que la mayoría de los otros tejidos adultos también tienen células madre, incluyendo el cerebro. Los

20 tumores derivados de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre de cáncer" de un tumor sólido) se someten subsiguientemente a desarrollo caótico a través de rondas tanto simétricas como asimétricas de divisiones celulares. En este modelo de células madre, los tumores sólidos contienen un

25 subconjunto distinto y limitado (posiblemente aún raro) de

19

células que comparten las propiedades de "células madre" normales, ya que proliferan de manera extensiva y dan lugar de manera eficiente tanto a células madre adicionales de tumor sólido (auto-renovación) y a la mayoría de células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. En realidad, las mutaciones dentro de una población de células madre de larga vida pueden iniciar la formación de células madre de cáncer que son la base del crecimiento y mantenimiento de tumores y cuya presencia contribuye a la falla de los planteamientos terapéuticos actuales.

La naturaleza de células madre del cáncer se reveló primero en el cáncer de sangre, leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) (Lapidot et al., 1994, *Nature* 17:645-8). Más recientemente, se ha demostrado que los tumores malignos de mama y colon, humanos, tienen similarmente una población pequeña, distinta de células madre de cáncer enriquecidas por la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes. Una población de células Lin ESA+, CD44+, CD24-baja, en tumores de mama se encontró que está enriquecida 50 veces para células tumorigénicas en comparación a células tumorales no fraccionadas (Al-Haij et al., 2003, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 100:3983-8). De manera similar, la subpoblación ESA+, CD44+ en tumores colorrectales se encontró que incluye de forma única células tumorigénicas, y la adición de CD166 a este perfil fue capaz de enriquecer adicionalmente células

153

madre de cáncer de colon (CoCSC) (Dalerba et al. 2007 *Proc Nat'l Acad Sci* 104:10158-63). La capacidad para aislar de forma eventual las células tumorigénicas de cáncer ha permitido la investigación de rutas biológicas críticas que son la base de la tumorigenicidad en estas células, y promete de esta manera el desarrollo de mejores ensayos de diagnóstico y productos terapéuticos para pacientes con cáncer. Es hacia este propósito que se dirige esta invención.

Breve Descripción de la Invención

10 Se proporcionan anticuerpos que se unen de manera específica a un epítipo de ligando 4 tipo Delta (DLL4) humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID No: 27) y el dominio DSL humano (SEQ ID No: 26), en donde el anticuerpo afecta el crecimiento tumoral.

15 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente se proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva y un

20 anticuerpo de DLL4 de la presente descripción.

Los objetos y ventajas adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o se pueden aprender por la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la

25 invención se realizarán y lograrán por medio de los elementos

154

y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones anexas. Se va a entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son sólo de ejemplo y explicativas y no son restrictivos de la invención, como se reivindica. Las figuras anexas, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias modalidades de la invención, y conjuntamente con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En la especificación y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", y "el(la)" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Unión Específica de anticuerpo 21M18 anti-DLL4 a proteína nativa de DLL4 de superficie celular. Con los anticuerpo anti-DLL4 y clasificado por FACS se incubaron células HEK 293 co-transfectadas con DLL4 de longitud completa y GFP. Los anticuerpos 21M14 y 21M18 anti-DLL4 muestran unión específica a células que expresan DLL4 como se revela por la relación lineal entre la unión del anticuerpo DLL4 y la expresión de GFP.

Figuras 2A-2B: Anticuerpos de DLL4 bloquean la interacción de DLL4 humano con el Receptor Notch. 2A) Se incubaron células HEK 293 que expresan DLL4 con Notch-Fc o proteína Fc de control en la presencia de anticuerpos de

15

control o DLL4. La alta intensidad de fluorescencia indica la presencia de la unión de DLL4 y Notch en la presencia de un anticuerpo de control (línea 1) y anticuerpos 21M12 anti-DLL4 (línea 5). La baja intensidad de fluorescencia indica la ausencia de interacciones de DLL4 y Notch en la ausencia de Notch (línea 1) y la interrupción de las interacciones de DLL4 y Notch en la presencia de anticuerpos 21M18 (línea 3) y 21M14 (línea 4) anti-DLL4. 2B) Con DLL4-Fc ya sea humano o murino se incubaron células HEK 293 que expresan NotchI. Se detectó la unión por anti-Fc fluorescentemente marcado y se analizó por FACS, con la alta intensidad de fluorescencia indicativa en la unión entre células que expresan NotchI y DLL4. 21M18 bloquea la unión de DLL4 humano (cuadros grises) pero no DLL4 murino (círculos negros) al receptor de Notch.

Figuras 3A-3E: Correlación de epítomos de anticuerpos anti-DLL4. 3A) Proteínas de fusión con supresiones anidadas del dominio intracelular de DLL4 humano se incubaron en un ensayo de ELISA con los anticuerpos 21M14 y 21M18 anti-DLL4. No se detectó la unión por arriba del fondo en la presencia de proteínas de fusión que contienen entre los aminoácidos 1 a 154 (aa 1-96), barra blanca con puntos negros; aa 1-154, barra negra con puntos blancos). En contraste, se encontró la unión entre anticuerpos anti-DLL4 y todas las proteínas de fusión que contienen entre aminoácidos 1 a 217, incluyendo el dominio DSL, de DLL4 (aa 1-217), barra rayada

56

horizontal; aa 1-251, barra rayada diagonal; aa 1-283, barra
sombreada; aa 1-323, barra gris con puntos blancos). 3B) Las
transferencias Western muestra la expresión de proteínas de
supresión C-terminales de DLL4 humano (h-DLL4) y proteínas de
5 fusión quiméricas de DLL4 humano-murino (anti-hFc; parte
superior). Las proteínas de fusión de DLL4 comprenden uno o
más dominios 1 a 6, donde los dominios 1 y 2 son aminoácidos 1
a 154 N-terminales; el domino 3 es el dominio DSL desde los
aminoácidos 155 a 217; y los dominios 4, 5 y 6 son cada uno un
10 dominio EGF como se representa gráficamente en C. Los
anticuerpos 21M18 reconocen la proteína de h-DLL4 sólo en la
presencia de los aminoácidos 1-217 (hDLL4dom 1-3). En
contraste a la proteína humana, las proteínas de fusión que
comprenden los aminoácidos 1-214 (dom 1-3) de DLL4 murino (m-
15 DLL4) no se reconocen por 21M18 (m-DLL4 dom1-3:h-DLL4dom4-6).
Aún las proteínas de fusión que comprenden los aminoácidos 1-
154 (dom1-2) de h-DLL4 en la presencia de dom3 murino se
reconocen por 21M18 (h-DLL4 dom1-2:mDLL4dom3-6). 3C) Se
muestra en un resumen esquemático de los datos de unión de B.
20 La estructura de domino de DLL4 se muestra en la parte
superior con las proteínas de fusión de DLL4 listadas y
mostradas esquemáticamente del lado izquierdo con la proteína
humana representada por gris claro y la proteína de ratón
representada por gris oscuro. La unión de 21M18 a cada
25 fragmento de DLL4 se indica por un "+" versus un "-". 3D)

V57

Análisis de ELISA de la unión de 21M18 a fragmentos de proteína de DLL4 que contienen sustitución de residuos murinos correspondientes por residuos humanos en posiciones seleccionadas. 21M18 presenta unión deteriorada a fragmentos de proteína de DLL4 con sustituciones en los aminoácidos 68, 69, y 71 (reemplazo de valina, valina, y prolina) o en los aminoácidos 142 y 144 (reemplazo de lisina y alanina). 3E) Análisis de ELISA de la unión de los anticuerpos 21M18 y 21M21 a los fragmentos de proteína de DLL4 que contienen sustitución de los correspondientes residuos murinos por residuos humanos en posiciones seleccionadas dentro del dominio DSL. El anticuerpo 21M21 presenta unión deteriorada a los fragmentos de proteína de DLL4 humano que contienen sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos 161 y 162 (reemplazo de treonina y serina). Puesto que 21M21 no deteriora la función de DLL4 en los ensayos de señalización (ver Figura 6), esto demuestra que no todos los anticuerpos que se unen a la región DSL impactan la función de DLL4.

Figuras 4A-4B: Alineación de secuencia de la región variable de cadena pesada. 4A) Secuencia de anticuerpo 21M21 murino parental (m-21M18-Vh, parte superior), secuencia de soporte expresada, humana (h-EST-soporte, intermedia) y secuencia de región variable de cadena pesada de 21M18 humanizada (21M18-H7, fondo) se muestran con residuos de aminoácido conservados sombreados en negro. Las tres CDR se

150

marcan mostrando retención de secuencias murinas parentales en el anticuerpo 21M18 humanizado. El residuo de cisteína en la posición 52a de Kabat en CDR2 se ha cambiado a un residuo de serina y valina sin pérdida de unión específica a DLL4 en 21M18 H7 y 21M18 H9, respectivamente. Las sustituciones dentro de la región de soporte, mostradas en 4A se numeran 1-6 con las posiciones de Kabat correspondiente en la cadena de Vh 16, 20, 27, 28, 38, 48. 4B) Secuencia de anticuerpo 21M18 murino parental (m-21M18-Vh, parte superior), secuencia de Vh de línea germinal humana (h-línea germinal-Vh, intermedia), y la secuencia de región variable de cadena pesada de 21M18 humanizada (21M18-H2, fondo), se muestran con residuos de aminoácidos conservados sombreados en negro. Las tres CDR se marcan mostrando retención de secuencias murinas parentales en el anticuerpo 21M18 humanizada. El residuo de cisteína en la posición 52a de Kabat en CDR2 se ha cambiado a una serina y a un residuo de valina sin pérdida de unión específica a DLL4 en 21M18 H7 y 21M18 H9, respectivamente. Los cinco residuos murinos retenidos dentro de la región de soporte variable de todas las variantes de cadenas pesadas se numeran 1-5 en sus correspondientes posiciones de Kabat 20, 28, 38, 48 y 69.

Figura 5: Alineación de secuencia de la región variable de cadena ligera. Secuencia de anticuerpos 21M18 murino parental (m-21M18-Vk, parte superior), secuencia de línea germinal humana (h-línea germinal Vk, fondo), y

VSA

secuencia de región variable de cadena ligera de 21M18 humanizada (21M18-L2, intermedia) se muestran con residuos de aminoácido conservados sombreados en negro. Las tres CDR se marcan mostrando la retención de secuencias murinas parentales en el anticuerpo 21M18 humanizado. Los dos residuos murinos retenidos dentro de la región de soporte, variable se numeran 1-2 en sus correspondientes posiciones de Kabat 22 y 36.

Figura 6: Señalización Notch de Bloque de Anticuerpos de DLL4. Se incubaron células HeLa co-transfectadas con el indicador Hes1-Luc y vectores de indicador de luciferasa de Renilla con la proteína de DLL4 en la presencia o ausencia de anticuerpos anti-DLL4. Niveles disminuidos de luciferasa demostraron pérdida de activación de ruta Notch de DLL4 por los anticuerpos 21M14 y 21M18.

Figuras 7A-7B: Anticuerpos de DLL4 Modulan la Expresión de Genes Objetivos Notch en Tumores de Colon. 7A) Se aislaron tumores de colon C8 tratados con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 o PBS (Control) y la expresión de HES1 y ATOH-1 determinada por RT-PCR cuantitativa. La expresión génica relativa (eje y) en comparación a células tratadas con control muestra que el tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 disminuyó la expresión de HES1 e incrementó la expresión de ATOH-1. 7B) Se muestra la relación de expresión relativa (eje y) de HES1 versus ATOH1 en colonias de células de tumores de colon OMP-C11 agotadas en linaje de ratón. Las colonias C11 cubiertas

160

con células 3T3 que expresan DLL4 (3T3+DLL4) mostraron un incremento en la relación de expresión de HES1/ATOH1 en comparación a células de colon cubiertas con células 3T3 (3T3) o no expuestas a la cubierta con células (control). Este
5 incremento en la relación de expresión de HES1/ATOH1 se eliminó por incubación con 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpos 21M18 (21M18) o inhibidor DBZ de secretasa 5 μM (GSI 5 μM).

Figura 8: Anticuerpos de DLL4 Reducen Crecimiento Tumoral. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células UM-C4
10 disociadas y se trataron con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 (n=5) o PBS (n = 10). El tratamiento con anticuerpos 21M18 (diamantes) redujo el crecimiento tumoral iniciando el día 23, y se observó una reducción de hasta 54 % por el día 48 en comparación a controles inyectados con PBS (cuadros negros).

15 Figura 9: Tratamiento con Anticuerpos de DLL4 Reduce el Número de Células Tumorales Proliferantes in Vivo. Se aislaron tumores de colon C8 tratados con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 o Ab de control. La inmunocitoquímica con un anticuerpo contra Ki67 mostró una reducción en el número de
20 células proliferantes en tumores tratados con 21M18 en comparación al control.

Figuras 10A-10B: Tratamiento con Anticuerpos de DLL4 en Combinación con Fluorouracilo (5-FU) Reduce Crecimiento Tumoral. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células UM-C4
25 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o PBS en la

Vbl

presencia o ausencia de 5-FU. 10A) El tratamiento con anticuerpos 21M18 en combinación con 5-FU (círculos, línea punteada) reduce el crecimiento tumoral 46 días después de la inyección de células tumorales a un mayor grado del tratamiento con ya sea 5-FU (triángulos, línea continua) o anticuerpos 21M18 (diamantes, línea punteada) solos y a un mayor grado que los controles inyectados con PBS (cuadrados, línea continua). El volumen del tumor en mm^3 se indica en el eje y. 10B) Gráficas de mediciones tumorales en el día 46 de animales individuales. Cada punto representa un animal. El tratamiento con anticuerpos 21M18 o 5-FU redujo cada uno el tamaño de tumor (mm^3) en comparación al control. Adicionalmente, el tratamiento de combinación con anticuerpos 21M18 y 5-FU tuvo un efecto aditivo, reduciendo el tamaño del tumor a 1/5 del tamaño de control.

Figura 11: Tratamiento con Anticuerpos de DLL4 en Combinación con Anticuerpos anti-EGFR Reduce el Crecimiento Tumoral. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células UM-C4 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o PBS en la presencia o ausencia de anticuerpos anti-EGFR. Las gráficas de mediciones tumorales en el día 46 de animales individuales se muestran. Cada punto representa un animal. El tratamiento con anticuerpos 21M18 o anticuerpos anti-EGFR redujo cada uno al tamaño de tumor (mm^3) en comparación al control. Adicionalmente, el tratamiento de combinación con 21M18 y

162

anticuerpos anti-EGFR tuvo un efecto aditivo, reduciendo el tamaño del tumor a menos de 1/5 el tamaño de control.

Figuras 12A-12B: mAb 21M18 anti-DLL4 e Irinotecan Actúan Sinérgicamente para Inhibir el Crecimiento de Tumor de Colon. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células C8 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o anticuerpo de control en la presencia o ausencia de Irinotecan. 12A) El tratamiento con anticuerpos 21M18 murinos (círculos) o Irinotecan (triángulos) redujo cada uno solo el volumen de tumor (eje y mm^3) en comparación a animales tratados con control (cuadros negros). Sin embargo, el tratamiento de combinación con 21M18 e Irinotecan (triángulos inversos) tiene un efecto sinérgico, eliminando completamente el crecimiento tumoral durante hasta 55 días pos-inyección de células. 12B) El tratamiento con 21M18 humanizado (h21M18) en combinación con Irinotecan (irtcn) (círculos) tiene eficiencia similar como 21M18 murino (h21M18) (triangulo) en comparación a anticuerpos de control (cuadros negros) o anticuerpo de control con Irinotecan (triangulo).

Figuras 13A-13B: Tratamiento de Combinación con 21M18 anti-DLL4 e Irinotecan Previene el Re-Crecimiento de Tumor de Colon. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células C8 disociadas y se trataron con Irinotecan o Irinotecan en combinación con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 ($n = 10$) por grupo). 13A) El tratamiento con Irinotecan solo desacelera el

V63

crecimiento de tumor de colon, pero el crecimiento continúa después del cese del tratamiento en el día 56 (* flecha) en todos menos dos animales tratados. 13B) En contraste, el tratamiento con una combinación de Irinotecan y anticuerpos 21M18 anti-DLL4 eliminó el crecimiento de tumor de colon tanto durante el tratamiento como durante hasta cinco semanas después del cese del tratamiento en el día 56 en los diez animales tratados. Cada línea representa la curva de crecimiento para un animal individual.

Figura 14: Tratamiento de Combinaron de 21M18 anti-DLL4 e Irinotecan Inhibe el Crecimiento de Tumores Establecidos de Colon de Manera Más Efectiva que el Tratamiento de Terapia Única. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células C8 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o anticuerpo de control en la presencia o ausencia de Irinotecan. El tratamiento con anticuerpos 21M18 (diamantes) o Irinotecan (triángulos) sólo redujo cada uno el volumen de tumor (eje y, mm³) en comparación a animales tratados con control (cuadros negros) Sin embargo, el tratamiento de combinación con 21M18 más Irinotecan (triángulos inversos) inhibió el crecimiento de tumor más efectivamente que ya sea el tratamiento único con 21M18 o con Irinotecan.

Figuras 15A-15B: Tumores Tratados con Anticuerpos Anti-DLL4 Muestran Números Disminuidos de Células Tumorigénicas. Se inyectaron ratones inmunocomprometidos (n =

164

10 por grupo) con dosis decrecientes de células tumorales del experimento mostrado en la Figura 14 que se ha tratado con ya sea anticuerpo de control, Irinotecan más anticuerpo de control, anticuerpos 21M18 de DLL4 solos, o una combinación de anticuerpos 21M18 de DLL4 e Irinotecan (Combinación). 15A) Resultados de tumor toman velocidad en el día 81. Se graficó el volumen del tumor (mm^3) en comparación al número de células tumorales humanas inyectadas: 900, 300, 100 y 50 para cada grupo de tratamiento. El número de animales con tumores detectables sobre los diez animales inyectados para cada dosis de células tumorales se registra por abajo de la gráfica de volumen de tumor para cada dosis de células con células tumorales tratadas con control a la izquierda (círculos rellenos), células tumorales tratadas con anticuerpo 21M18 anti-DLL4 segundas a la izquierda (cuadros abiertos), células tumorales tratadas con Irinotecan segundas a la derecha (triángulos rellenos), y células tumorales tratadas con combinación a la derecha (círculos abiertos). 15B) Se calculó la frecuencia de células madre en el día 81. La proporción de células madre de cáncer (eje y) de células tumorales tratadas con control (izquierda) en comparación a tratadas con anti-DLL4 (segundo de izquierda), sólo tratadas con Irinotecan (segundo de derecha), y tratadas con combinación (derecha) se grafica con el intervalo de confianza de 95 %. El grupo tratado con anti-DLL4 tiene una diferencia estadísticamente

V65

significativa versus el grupo de control (*) y el grupo de combinación es significativamente diferente versus tanto grupo de control (*) como grupo con Irinotecan solo (**).

Figura 16: Tratamiento de Combinación con 21M18 Anti-DLL4 e Irinotecan Retrasa Reincidencia de Tumor. Se inyectaron ratones inmunocomprometidos con células C8 disociadas y tumores establecidos de aproximadamente 150 mm³ se trataron con una combinación de Irinotecan (45 mg/kg, dosificado dos veces por semana) con ya sea anticuerpos 21M18 anti-DLL4 o anticuerpos de control durante 32 días después de lo cual se detuvo el tratamiento con Irinotecan. El tratamiento con ya sea el anticuerpo de control o 21M18 continuó. Se retrasó la reincidencia de tumores por volumen tumoral (eje y) en animales tratados con 21M18 (triángulos) en comparación a controles (círculos).

Figura 17: Tratamiento de Combinación con 21M18 Anti-DLL4 e Irinotecan Retrasa Reincidencia de Tumor. Se muestran los animales individuales del experimento mostrado en la Figura 16. El volumen total de tumor (eje y) de cada animal se muestra 47 días después de la terminación de tratamiento con Irinotecan.

Figura 18. La Combinación con 21M18 anti-DLL4 y anti-VEGF Reduce el Crecimiento de Tumor. Se implantaron células tumorales C17 y se inició el tratamiento dos días después con ya sea anticuerpo de control (cuadros negros,

166

línea continua), 21M18 (triángulos, línea punteada), anti-VEGF (diamantes, línea continua), o la combinación de ambos anticuerpos (círculos, línea punteada). Cada anticuerpo se dosificó a 10 mg/kg, dado dos veces por semana y hubo 10 animales por grupo. Tanto 21M18 como anti-VEGF redujeron el crecimiento tumoral y la combinación fue más efectiva que cualquier anticuerpo solo.

Descripción Detallada de la Invención

El término "anticuerpo" se usa para querer decir una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidratos, polinucleótido, lípido, o combinaciones de lo anterior a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos antagonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer e interfieren con, por ejemplo, la unión de ligando, dimerización de receptor, expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer, y/o señalización de etapa posterior de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos incluyen anticuerpos agonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer y promueven, por ejemplo, la unión de ligando,

167

la dimerización de receptor, y/o la señalización por una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos no interfieren con o no promueven la actividad biológica de una proteína marcadora de células madre de cáncer pero inhiben el crecimiento tumoral por ejemplo por internalización del anticuerpo y/o por reconocimiento por el sistema inmunitario. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tal como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), mutantes de Fv de cadena individual (scFv), anticuerpos multiespecíficos tal como anticuerpos biespecíficos generados de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula modificada de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno en tanto que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), en base a la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las diferentes clases

168

de inmunoglobulinas tienen estructuras diferentes y bien conocidas de subunidades y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden estar descubiertos o conjugados a otras moléculas tal como toxinas, radioisótopos, etc.

5 Como se usa en la presente, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a
10 fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena individual, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo de Fv" se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión y
15 reconocimiento a antígeno ya sea como dos cadenas, en la cual un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera forman un dímero no covalente, o como una cadena individual (scFv), en la cual un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera se enlazan covalentemente por un ligador peptídico
20 flexible de modo que las dos cadenas se asocien en una estructura dimérica similar. En esta configuración, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir la especificidad de unión a antígeno del dímero de Fv. De manera alternativa, se
25 puede usar un dominio variable individual (o la mitad de un

169

Fv) para reconocer y unirse al antígeno, aunque en general con menor afinidad.

Un "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a una población homogénea de anticuerpos comprendida en el reconocimiento altamente específico y en la unión de un determinante antigénico individual, o epítipo. Esto es en contraste a anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa así como fragmentos de anticuerpo (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), mutantes de cadena individual (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula modificada de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Adicionalmente, "anticuerpo monoclonal" se refiere a estos anticuerpos hechos de cualquier número de maneras que incluyen, pero no se limitan a por hibridoma, selección en fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas

170

humanas en las cuales los residuos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) dentro de la región de determinación de antígeno (o región hipervariable) de la región variable de una cadena o cadenas de anticuerpos se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad deseada, afinidad deseada y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región de soporte (FR) de cadena variable de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución del residuo adicional ya sea en la región de soporte variable y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos o tres o cuatro, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones de CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana en tanto que todas o sustancialmente todas las regiones de FR son aquéllas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o dominio

(Fc), típicamente aquélla de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente de los Estados Unidos número 5,225,539.

5 El término "anticuerpo humano" como se usa en la presente significa un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano hecho usando cualquier técnica conocida. Esta definición de un
10 anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humana tal como por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena pesada humana y de cadena ligera
15 murina.

"Anticuerpos híbridos" son moléculas de inmunoglobulina en las cuales se montan conjuntamente pares de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos con diferentes regiones determinantes antigénicas de modo que se pueden
20 reconocer dos diferentes epítomos o dos diferentes antígenos y se unen por el tetrámero resultante.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies.
25 Típicamente, la región variable de tanto cadenas ligeras como

192

pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etcétera) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas en tanto que las regiones constantes son
5 homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otro (usualmente humano) para evitar producir una respuesta inmunitaria en esa especie.

El término "epítopo" o "determinante antigénico" se usan de manera indistinta en la presente y se refieren a
10 aquella porción de un antígeno capaz de ser reconocida y unida específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, se pueden formar epítopos tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegado terciario de una proteína. Los
15 epítopos formados de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la desnaturalización de la proteína, en tanto que los epítopos formados por el plegado terciario se pierden típicamente en la desnaturalización de la proteína. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, y más usualmente, al
20 menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

La competición entre anticuerpos se determina por un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión
25 competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o

123

indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de intercalación (ver Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242-253 (1983)); EIA de biotina-avidina, directo, de fase sólida (ver Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614-3619 (1986)); ensayo marcado, directo de fase sólida, ensayo de intercalación, marcado, directo de fase sólida (ver Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa, de fase sólida que usa la marca I-125 (ver Morel et al., Molec. Immunol. 25(1):7-15 (1988)); EIA de biotina-avidina, directo de fase sólida (Cheung et al., Virology 176:546-552 (1990)); y RIA marcado, directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77-82 (1990)). Típicamente, este ensayo comprende el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que tienen cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. Se mide la inhibición competitiva al determinar la cantidad de marca unida a la superficie sólida o a células en la presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un péptido adyacente suficientemente próximo al

epítopo unido por el anticuerpo de referencia para que se presente impedimento estérico. Usualmente, cuando está presente un anticuerpo competidor en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un
5 antígeno común por al menos 50 ó 75 %.

Que un anticuerpo "se una selectivamente" o "se una específicamente" significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de lo
10 anterior a un epítopo que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. "Se une de manera selectiva" o "se une de manera específica" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D de al menos aproximadamente 0.1 mM, pero más usualmente al menos
15 aproximadamente 1 μ M. "Se une de manera selectiva" o "se une de manera específica" significa a veces que un anticuerpo se une a una proteína a veces con una K_D de al menos aproximadamente 0.1 μ M o mejor, y otras veces al menos aproximadamente 0.01 μ M o mejor. Debido a la identidad de
20 secuencias entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína marcadora de células madre de cáncer en más de una especie.

Como se usa en la presente, los términos "unión no
25 específica" y "unión de fondo" cuando se usan con referencia a

MS

la interacción de un anticuerpo y una proteína o un péptido se refieren a una interacción que no es dependiente de la presencia de una estructura particular (es decir, el anticuerpo se une a proteínas en general en lugar que una estructura particular tal como un epítipo).

Los términos "aislado" o "purificado" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto desempeño. Una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o un ácido nucleico de la presente descripción que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de cuadros de lectura abiertos que flanquean de forma natural el gen y codifica para proteínas diferentes de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado se separa de otras proteínas no de inmunoglobulina y de otras proteínas de inmunoglobulina con diferente especificidad de unión al antígeno. También puede significar que el ácido nucleico o proteína esté en algunas modalidades al menos 80 % puro, en algunas modalidades al menos 85 % puro, en algunas modalidades al menos 90 % puro, en algunas modalidades al menos 95 % puro, y en algunas modalidades al menos 99 % puro.

176

Como se usa en la presente, el término "cáncer" y "cancerígeno" se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos en la cual una población de células se caracteriza por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

Los términos "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refieren a trastornos asociados con proliferación celular anormal tal como cáncer.

"Tumor" y "neoplasma" como se usa en la presente se refieren a cualquier masa de tejido que resulte de crecimiento celular excesivo o proliferación celular excesiva, ya sea benigno (no cancerígeno) o maligno (cancerígeno) incluyendo lesiones pre-cancerígenas.

"Metástasis" como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual un cáncer se extiende o transfiere del sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerígena similar en la nueva ubicación. Una
5 célula "metastásica" o "en metástasis" es una que pierde contacto adhesivo con células vecinas y migran mediante al corriente sanguínea o linfas del sitio primario de enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.

Los términos "célula madre de cáncer", "célula madre
10 de tumor", o "célula madre de tumor sólido" se usan de manera indistinta en la presente y se refieren a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen capacidad proliferativa extensiva; (2) son capaces de división celular asimétrica para generar una o más clases de progenie
15 diferenciada con potencial proliferativo o de desarrollo, reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para autorrenovación o automantenimiento. Estas propiedades de las "células madre de cáncer", "células madre de tumor" o "células madre de tumor sólido" confieren a estas células
20 madre de cáncer la capacidad de formar tumores palpables en el trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación a la mayoría de tumores sólidos que fallan para formar tumores. Las células madre de cáncer sufren autorrenovación versus diferenciación de una manera caótica
25 para formar tumores con tipos celulares anormales que pueden

178

cambiar durante el tiempo conforme se presenten mutaciones. Las células madre de tumor sólido difieren de la "línea de células madre de cáncer" proporcionada por la patente de los Estados Unidos número 6,004,528. En esta patente, la "línea

5 de células madre de cáncer" se define como un tipo de células progenitoras que crecen lentamente que por sí mismas tienen pocas mutaciones pero que sufren divisiones celulares simétricas en lugar de asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que se presentan en el ambiente de la célula.

10 Esta hipótesis de la "línea de células madre de cáncer" propone de esta manera que células tumorales rápidamente proliferantes, ciertamente mutadas surgen en su mayor parte como resultado de un ambiente anormal, que provoca que las células madre relativamente normales se acumulen y entonces

15 sufran mutaciones que les provocan llegar a ser células tumorales. La patente de los Estados Unidos número 6,004,528 propone que este modelo se pueda usar para mejorar la diagnosis de cáncer. El modelo de células madre de tumor sólido es fundamentalmente diferente del modelo de "línea de

20 células madre de cáncer" y como resultado exhibe utilidades no ofrecidas por el modelo de "línea de células madre de cáncer". Primero, las células madre de tumor sólido no están "mutacionalmente reservadas". La "línea de células madre de cáncer mutacionalmente reservadas" descrita por la patente de

25 los Estados Unidos número 6,004,528 se puede considerar una

199

lesión pre-cancerígena, en tanto que las células madre de tumor sólido son células de cáncer que pueden contener por sí mismas las mutaciones que son responsables de que la tumorigénesis empiece en la etapa precancerígena hasta el

5 cáncer de etapa tardía. Es decir, las células madre de tumor sólido ("células madre de cáncer") se incluirán entre las células altamente mutadas que se distinguen de la "línea de células madre de cáncer" en la patente de los Estados Unidos número 6,004,528. Segundo, las mutaciones genéticas que

10 conducen a cáncer pueden ser en su mayor parte intrínsecas dentro de las células madre de tumor sólido así como ser ambientales. El modelo de células madre de tumor sólido predice que las células madre aisladas de tumor sólido pueden dar origen a tumores adicionales en el trasplante (explicando

15 de esta manera la metástasis) en tanto que el modelo de "línea de células madre de cáncer" predecirá que las células trasplantadas de la "línea de células madre de cáncer" no será capaz de dar origen a un nuevo tumor, puesto que fue su ambiente anormal que fue tumorigénico. En realidad, la

20 capacidad para trasplantar células madre de tumor sólido, humanas, disociadas y fenotípicamente aisladas a ratones (en un ambiente que es muy diferente del ambiente tumoral normal) donde forman aún nuevos tumores distingue la presente invención del modelo de "línea de células madre de cáncer".

25 Tercero, las células madre de tumor sólido igualmente se

dividen tanto de forma simétrica como de manera asimétrica, tal que la división celular simétrica no es una propiedad obligada. Cuarto, las células madre de tumor sólido pueden dividirse rápidamente o de forma lenta, dependiendo de muchas variables, tal que una lenta velocidad de proliferación no es una característica definitoria.

Los términos "célula de cáncer", "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor o una lesión pre-cancerígena incluyendo tanto células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células tumorales, y las células madre tumorigénicas (células madre de cáncer).

Como se usa en la presente, "tumorigénico" se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido que incluye las propiedades de autorrenovación (que da lugar a células madre adicionales de cáncer, tumorigénicas) y proliferación para generar otras células tumorales (que da origen a células tumorales diferenciadas y de esta manera no tumorigénicas) que permite que las células madre de tumor sólido formen un tumor.

Como se usa en la presente, los términos "marcadores de cáncer de células madre", "marcadores de células madre de cáncer", "marcadores de células madre de tumor", o "marcadores de células madre de tumor sólido" se refieren a un gen o genes o una proteína, polipéptido, o péptido expresado por el gen o

181

genes cuyo nivel de expresión, solo o en combinación con otros genes, se correlacione con la presencia de células tumorigénicas de cáncer en comparación a células no tumorigénicas. La correlación puede relacionarse ya sea a una
5 expresión incrementada o disminuida del gen (por ejemplo, niveles incrementados o disminuidos de ARNm o el péptido codificado por el gen).

Como se usa en la presente, los términos "biopsia" o "tejido de biopsia" se refieren a una muestra de tejido o
10 fluido que se remueve de un sujeto para el propósito de determinar si la muestra contiene tejido cancerígeno. En algunas modalidades, el tejido de biopsia o fluido de biopsia se obtiene debido a que se sospecha que un sujeto tiene cáncer, y el tejido o fluido de biopsia entonces se examina
15 para la presencia o ausencia de cáncer.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que va a ser el receptor de un
20 tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera indistinta en la presente en referencia a un sujeto humano.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o
25 estatal o listada en la farmacopea de los Estados Unidos u

otras farmacopeas en general reconocidas para el uso en animales, incluyendo humanos.

"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y que
5 posee la actividad farmacológica deseada del compuesto de origen.

"Excipiente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptables" se refiere a un excipiente, portador o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con al menos un
10 anticuerpo de la presente descripción, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra a dosis suficiente para distribuir una cantidad terapéutica del compuesto.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a
15 un diluyente, adyuvante, excipiente, o portador con el cual se administre al menos un anticuerpo de la presente descripción.

"Profármaco" se refiere a un derivado de un compuesto terapéuticamente efectivo que requiere una transformación dentro del cuerpo para producir el compuesto
20 terapéuticamente efectivo. Los profármacos pueden ser farmacológicamente inactivos hasta convertirse al compuesto terapéuticamente efectivo de origen.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido,
25 polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco

efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño de tumor; inhibir o
5 detener la infiltración de células de cáncer en los órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con
10 el cáncer, reducir la morbilidad y mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de estos efectos. Al grado que el fármaco impide el crecimiento y/o aniquila células existentes de cáncer, se puede referir como citostático y/o citotóxico.

15 Como se usa en la presente, "que proporciona un diagnóstico" o "información de diagnóstico" se refiere a cualquier información, incluyendo por ejemplo la presencia de células madre de cáncer, que es útil en determinar si un paciente tiene una enfermedad o condición y/o en clasificar la
20 enfermedad o condición en una categoría fenotípica o cualquier categoría que tenga significado con respecto a la prognosis de o igualmente a la respuesta a tratamiento (ya sea tratamiento en general o cualquier tratamiento particular) de la enfermedad o condición. De manera similar, diagnosis se
25 refiere a proporcionar cualquier tipo de información de

diagnóstico, incluyendo, pero no limitado a, si un sujeto es probable que tenga una condición (tal como un tumor), si el tumor de un sujeto comprende células madre de cáncer, información relacionada a la naturaleza o clasificación de un tumor como por ejemplo un tumor de alto riesgo o un tumor de bajo riesgo, información relacionada a la prognosis y/o información útil en seleccionar un tratamiento apropiado. La selección del tratamiento puede incluir la elección de un agente quimioterapéutico particular o de otra modalidad de tratamiento tal como cirugía o radiación o una elección acerca de si se retiene o libera la terapia.

Como se usa en la presente, los términos "que proporciona una prognosis", "información de pronóstico", o "información predictiva" se refieren a proporcionar información, incluyendo por ejemplo la presencia de células madre de cáncer en el tumor de un sujeto, con respecto al impacto de la presencia de cáncer (por ejemplo, como se determina por los métodos de diagnóstico de la presente invención) en la salud futura de un sujeto (por ejemplo, morbilidad o mortalidad esperada, la probabilidad de padecer cáncer, y el riesgo de metástasis).

Los términos tal como "que trata" o "tratamiento" o "para tratar" o "que alivia" o "para aliviar" se refieren ambos a 1) medidas terapéuticas que curan, retrasan, disminuyen, los síntomas de, y/o detienen el progreso de una

18/5

condición o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o desaceleran el desarrollo de una condición o trastorno patológico seleccionado como objetivo. De esta manera, aquéllos en
5 necesidad de tratamiento incluyen aquéllos ya con el trastorno; y aquéllos propensos a tener el trastorno; aquéllos en quienes se va a prevenir el trastorno. Un sujeto "trata" de manera exitosa de acuerdo a los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes:
10 una reducción en el número de o ausencia completa de células de cáncer; una reducción en el tamaño de tumor; la inhibición de o una ausencia de infiltración de células de cáncer en órganos periféricos que incluye, por ejemplo, la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; la inhibición de una
15 ausencia de metástasis de tumor; la inhibición o una ausencia del crecimiento tumoral; el alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducida; mejora la calidad de vida; o alguna combinación de los efectos.

20 Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótido o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) enlazadas mediante enlaces de
25 fosfodiéster, incluyendo pero no limitado a, ADN o ARN. El

término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos base conocidos de ADN y ARN, incluyendo, pero no limitado a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-

5 (carboxihidroxi)metil-uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-

10 metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster

15 metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo,

20 queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

La frase "condiciones de hibridación severa" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su subsecuencia objetivo, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no a otras secuencias. Las condiciones

25 severas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en

diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridizan específicamente a mayores temperaturas. Se encuentra una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acids assays" (1993). En general, se seleccionan condiciones severas para que sean aproximadamente 5-10°C por abajo del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica definida, pH. La T_m es la temperatura (bajo concentración iónica definida, pH, y concentración nucleica) a la cual 50 % de las sondas complementarias al objetivo hibridizan a la secuencia objetivo en equilibrio (puesto que las secuencias objetivo están presentes en exceso, a T_m , 50 % de las sondas se ocupan en equilibrio). Las condiciones severas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tal como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo, de manera preferente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación severas de ejemplo pueden ser como sigue: 50 % de formamida, 5 x SSC, y 1 % SDS, incubando a 42°C, o, 5 x SSC, 1 % SDS incubando a 65°C, con lavado en 0.2 x SSC, y 0.1 % SDS a 65°C.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido

nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido se puede codificar por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante en tanto que se retengan la actividad deseada o propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión de ligando, transducción de señal, inmunogenicidad, etc.) del fragmento o longitud completa. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante tanto en los extremos 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo tal que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se refieren como secuencias no traducidas 5'. Las secuencias localizadas 3' o hacia abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se refieren como secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes llamadas "intrones" o "regiones de intervención" o "secuencias de intervención". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en el ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tal como intensificadores. Los

intrones se remueven o "desempalman" del transcrito nuclear o primario; los intrones por lo tanto están ausentes en el transcrito del ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u orden de aminoácidos en un polipéptido naciente. Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas tanto en el extremo 5' como en el 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se refieren como secuencias o regiones de "flanqueo" (estas secuencias de flanqueo están localizadas 5' o 3' a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región de flanqueo 5' puede contener secuencias reguladoras tal como promotores e intensificadores que controlan o tienen influencia en la transcripción del gen. La región de flanqueo 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, escisión post-transcripcional y poliadenilación.

El término "recombinante" cuando se usa con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se han modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo, la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. De esta manera, por ejemplo, las células

190

recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se sobreexpresan o se expresan de otro modo de forma anormal tal como por ejemplo, expresados como fragmentos que no se presentan de manera natural o variantes de empalme.

5 Por el término "ácido nucleico recombinante" se quiere decir en la presente ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, por la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontradas normalmente en la naturaleza. De esta manera, el

10 enlace operable de diferentes secuencias se logra. De esta manera, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* al ligar moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consideran ambos

15 recombinantes para los propósitos de esta invención. Se entiende que una vez que se hace un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula hospedadora u organismo, se replicará de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedadora

20 en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, estos ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque replicados subsiguientemente de forma no recombinante, aún se consideran recombinantes para los propósitos de la invención.

De manera similar, una "proteína recombinante" es una proteína

25 hecha usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la

val

expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

Como se usa en la presente, el término "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su ambiente natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo a un organismo que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, adicionado en múltiples copias, enlazado a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de genes endógenos ya que las secuencias de genes heterólogos típicamente se unen a secuencias de ADN que no se encuentran de forma natural asociadas con las secuencias génicas en el cromosoma o se asocian con porciones del cromosoma no encontradas en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en locus donde normalmente no se expresa el gen).

Como se usa en la presente, el término "vector" se usa con referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmentos de ADN desde una célula a otra. El término "vehículo" algunas veces se usa de manera indistinta como "vector". Los vectores frecuentemente se derivan de plásmidos, bacteriófagos, o virus vegetales o animales.

"Ligación" se refiere al proceso de formar enlaces de fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble hebra. Al menos que se proporcione de otro modo, se

jar

puede lograr la ligación usando amortiguadores y condiciones conocidas con 10 unidades de T4-ADN-ligasa ("ligasa") por 0.5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que se ligan. La ligación del ácido nucleico puede servir para enlazar dos proteínas conjuntamente en cuadro para producir una proteína individual, o proteína de fusión.

Como se usa en la presente, el término "expresión génica" se refiere al proceso de convertir información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, o ARNsn) a través de la "transcripción" del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una ARN-polimerasa), y para los genes que codifican para la proteína, en la proteína a través de la "traducción" del ARNm. Se puede regular la expresión del gen en muchas etapas en el proceso.

El "favorecimiento de la expresión" o la "activación" se refieren a la regulación que incrementa la producción de productos de expresión génica (por ejemplo, ARN, o proteína), en tanto que la "reducción de la expresión" o "represión" se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están comprendidas en el favorecimiento de la expresión o en la reducción de la expresión frecuentemente se llaman "activadores" y "represores", respectivamente.

Los términos "polipéptido", "péptido", "proteína", y "fragmento de proteína" se usan de manera indistinta en la

193

presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácido son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido que se presenta de manera natural, así como a polímeros de aminoácidos que se presentan de manera natural y a polímeros de aminoácidos que no se presentan de manera natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos que se presentan de manera natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se presentan de forma natural. Los aminoácidos que se presentan de forma natural son aquéllos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se presenta de forma natural, por ejemplo, un carbón alfa que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metil-sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se presenta de forma natural. Los miméticos de aminoácido

se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido que se presenta de forma natural.

5 "Variantes conservadoramente modificadas" aplica tanto a secuencias de aminoácidos como secuencias de ácido nucleico. Las "variantes de aminoácido" se refieren a secuencias de aminoácidos. Con respecto a las secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes

10 conservadoramente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican para secuencias idénticas o esencialmente idénticas de aminoácidos, o donde el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas (por ejemplo,

15 naturalmente contiguas). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para muchas proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. De esta manera, en cada posición donde se especifica

20 una alanina por un codón, el codón se puede alterar a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácido nucleico son "variaciones poco notorias", que son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de

25 ácido nucleico en la presente que codifica para un polipéptido

PAS

también describe variaciones poco notorias del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico "excepto AUG, que ordinariamente es el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptofano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, las variaciones poco notorias de un ácido nucleico que codifican para un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias reales de sonda. Con respecto a las secuencias de aminoácido, un experto en la técnica reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que alteran, adicionan o suprimen un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia purificada es una "variante conservadoramente modificada" que incluye donde la alteración da por resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Estas variantes conservadoramente modificadas además de y no excluyente variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de la invención. Las sustituciones típicamente conservadoras incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N),

196

Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I),
Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F),
Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y
8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por ejemplo, Creighton,
5 Proteins (1984)).

El término "marcado con epítopo " como se usa en la
presente se refiere a un polipéptido quimérico que comprende
una proteína marcadora de células madre de cáncer, o una
secuencia de dominio o porción de la misma, fusionado a una
10 "marca de epítopo". El polipéptido de marca de epítopo
comprende suficientes residuos de aminoácido para proporcionar
un epítopo para reconocimiento por un anticuerpo, aún es
suficientemente corto tal que no interfiere con la actividad
de la proteína marcadora de células madre de cáncer. Las
15 marcas de epítopo adecuadas tienen en general al menos seis
residuos de aminoácido, usualmente entre aproximadamente 8 a
aproximadamente 50 residuos de aminoácido, y a veces
entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 residuos. Las
marcas comúnmente usadas de epítopos incluyen las marcas Fc,
20 HA, His, y FLAG.

La presente invención proporciona composiciones y
métodos para estudiar, diagnosticar, caracterizar y tratar
cáncer. En particular, la presente invención proporciona
anticuerpos contra marcadores de células madre de tumores
25 sólidos y métodos para usar esos anticuerpos para inhibir el

crecimiento tumoral y para tratar cáncer en pacientes humanos. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos antagonistas que se unen de manera específica a una proteína marcadora de células madre de

5 cáncer e interfieren con, por ejemplo, la unión de ligando, dimerización de receptor, expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer, y/o señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos incluyen anticuerpos agonistas que

10 se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer y promueve, por ejemplo, la unión de ligando, dimerización de receptor, y/o señalización por una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos no interfieren con o promueven la

15 actividad biológica de una proteína marcadora de células madre de cáncer pero inhiben el crecimiento tumoral, por ejemplo, por internalización y/o reconocimiento por el sistema inmunitario. En ciertas modalidades, los anticuerpos reconocen de manera específica más de una proteína marcadora

20 de células madre de tumores sólidos.

Se proporciona un anticuerpo aislado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde el anticuerpo

25 afecta el crecimiento de un tumor. En ciertas modalidades, el

anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona adicionalmente un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o una composición farmacéutica de la presente descripción. En ciertas modalidades, el anticuerpo se conjuga a una porción citotóxica. En ciertas modalidades, el método comprende además administrar al menos un agente terapéutico adicional apropiado para efectuar la terapia de combinación. En ciertas modalidades, las células de tumor se eligen de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor de próstata, tumor pancreático, y un tumor de cabeza y cuello.

Igual que los tejidos en los cuales se originan, los tumores sólidos consisten de una población heterogénea de células. Que la mayoría de estas células carecen de tumorigenicidad sugiere que el desarrollo y mantenimiento de los tumores sólidos también depende de una pequeña población de células madre (por ejemplo, células tumorigénicas de

100

cáncer) con la capacidad para proliferar y dar origen eficientemente tanto a células madre adicionales de tumor (auto-renovación) y a la mayoría de las células de tumor más diferenciadas que carecen de potencial tumorigénico (es decir, células de cáncer no tumorigénicas). El concepto de células madre de cáncer se introdujo primero brevemente después del descubrimiento de células madre hematopoyéticas (HSC) y se estableció experimentalmente en leucemia mielógena aguda (AML) (Park et al., 1971, *J. Natl. Cancer Inst.* 46:411-22; Lapidot et al., 1994, *Nature* 367:645-8; Bonnet & Dick, 1997, *Nat. Med.* 3:730-7; Hope et al., 2004, *Nat. Immunol.* 5:738-43). Más recientemente se han aislado células madre de tumores sólidos en base a su expresión de un patrón único de receptores de superficie celular y en la valoración de sus propiedades de autorrenovación y proliferación en cultivo y en modelos de animal de xenoinjerto. Se descubrió una población ESA+ CD44+ CD24-/linaje bajo mayor que 50 veces enriquecida para la capacidad para formar tumores con relación a células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., 2003, *Proc. Nat'l, Acad. Sci.* 100:3983-8). La capacidad para aislar células madre tumorigénicas de cáncer a partir de la masa de células tumorales no tumorigénicas ha conducido a la identificación de marcadores de células madre de cáncer, genes con expresión diferencial en células madre de cáncer en comparación a células no tumorigénicas de tumor o epitelio normal de mama,

usando análisis de microarreglo. La presente invención emplea el conocimiento de estos marcadores identificados de células madre de cáncer para diagnosticar y tratar cáncer.

Los marcadores de células madre de cáncer de la presente invención se refieren a DLL4 humano, un ligando de receptor de Notch. La ruta de señalización de Notch es uno de varios reguladores críticos de formación de patrón embrionario, mantenimiento de tejido post-embriónico, y biología de células madre. De manera más específica, la señalización de Notch está comprendida en el proceso de inhibición lateral entre destinos celulares adyacentes y juega un papel importante en la determinación del destino celular durante divisiones celulares asimétricas. La señalización desregulada de Notch se asocia con numerosos cánceres humanos donde puede alterar el destino de desarrollo de células de tumor para mantenerlas en un estado indiferenciado y proliferativo (Brennan y Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69). De esta manera, la carcinogénesis puede proseguir al usurpar mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación normal de tejido por población de células madre (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324).

El receptor de Notch se identificó primero en mutantes de *Drosophila*. La haploinsuficiencia de Notch de *Drosophila* da por resultado muescas en el margen del ala en tanto que la pérdida de función produce un fenotipo

"neurogénico" letal embrionario donde las células de la epidermis cambian el destino a tejido neural (Moohr, 1919, Genet. 4:252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83:271). El receptor de Notch es un receptor transmembrana de paso único que contiene numerosas repeticiones en tándem tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y repeticiones de Notch/LIN-12 ricas en cisteína dentro de un dominio extracelular grande (Wharton et al., 1985, Cell 43:567; Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094; revisado en Artavenis et al., 1999, Science 284:770). Se han identificado cuatro proteínas de Notch de mamífero (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4), y las mutaciones en estos receptores dan por resultado invariablemente anormalidades de desarrollo y patologías humanas que incluyen varios cánceres como se describe en detalle más adelante (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25).

El receptor de Notch se activa por ligandos transmembrana de paso único de la familia Delta, Serrado, Lag-2 (DSL). Los ligandos de Notch conocidos en mamíferos, tipo Delta 1 (Dll1), tipo Delta 3 (Dll3), tipo Delta 4 (Dll4), Dentado 1 y Dentado 2, se caracterizan por un dominio DSL y repeticiones en tándem tipo EGF dentro del dominio extracelular. El dominio extracelular del receptor de Notch interactúa con aquél de sus ligandos, típicamente en células

adyacentes, dando por resultado dos escisiones proteolíticas de Notch, una escisión extracelular mediada por una ADAM-proteasa y una escisión dentro del dominio transmembrana mediada por gamma-secretasa. Esta escisión posterior genera el dominio intracelular de Notch (NICD). El NICD entonces entra al núcleo donde activa la familia CBF1, Supresor de Pelón [Su(H)], Lag-2 (CSL) de factores de transcripción como los principales efectores en la dirección 3' para incrementar la transcripción de factores de transcripción de hélice-asa-hélice, básicos, nucleares de la familia peludo e intensificador de división [E(sp1)] (Artavanis et al., 1999, Science 284:770; Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). También pueden existir en mamíferos (Martinez et al., 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33), rutas intracelulares alternativas que comprenden la proteína citoplásmica Deltex identificada en Drosophila, y esta ruta dependiente de Deltex puede actuar para suprimir la expresión de los genes objetivo Wnt (Brennan et al., 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence et al., 2001, Curr. Biol. 11:375-85).

Las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) son las células madre mejor entendidas en el cuerpo, y la señalización de Notch está implicada tanto en su mantenimiento normal así como en la transformación leucémica (Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73). Las HSC

son una población rara de células que reside en un nicho estomal dentro de la médula ósea de adulto. Estas células se caracterizan tanto por un perfil único de expresión génica así como por una capacidad para dar origen de forma continua a células progenitoras más diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético completo. La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en las HSC y células progenitoras establece líneas de células inmortalizadas que generan tanto células linfoides como mieloides *in vitro* y en ensayos de reconstitución a largo plazo (Varnum-Finney et al., 2000, Nat. Med. 6:1278-81), y la presencia de Dentado 1 incrementa el injerto de poblaciones de células de médula ósea humana enriquecidas para HSC (Karanu et al., 2000, J. Exp. Med. 192:1365-72). Más recientemente, se ha demostrado la señalización de Notch en las HSC *in vivo* y mostró estar comprendida en la división de la diferenciación de las HSC. Adicionalmente, la señalización de Notch parece ser requerida para la auto-renovación de las HSC mediada por Wnt (Duncan et al., 2005, Nat. Immunol. 6:314).

La ruta de señalización de Notch también juega un papel central en el mantenimiento de células madre neurales y está implicada tanto en su mantenimiento normal así como en cánceres de cerebro (Kopper & Hadju, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73; Purow et al., 2005, Cancer Res. 65:2353-63; Hallahan et al., 2004, Cancer Res. 64:7794-800). Las células madre

neurales dan origen a todas las células neurales y gliales en el sistema nervioso de los mamíferos durante el desarrollo, y más recientemente se han identificado en el cerebro de adulto (Gage, 2000, Science 287:1433-8). Ratones deficientes de Notch1; los genes objetivo de Notch Hes1, 3 y 5; y un regulador de la señalización de Notch, presenilina1 (PS1) muestran números disminuidos de células madre neurales embrionicas. Adicionalmente, se reducen las células madre neurales de adulto en los cerebros de ratones heterocigotos PS1 (Nakamura et al., 2000, J. Neurosci. 20:283-93; Hitoshi et al., 2002, Genes Dev. 16:846-58). La reducción en las células madre neurales parece resultar de su diferenciación prematura en neuronas (Hatakeyama et al., 2004, Dev. 131:5539-50) sugiriendo que la señalización de Notch regula la diferenciación y autorrenovación de las células madre neurales.

La señalización anormal de Notch está implicada en varios cánceres humanos. El gen de NOTCH1 en humanos se identificó primero en un subconjunto de leucemias linfoblásticas agudas de células T como un locus traslocado que da por resultado la activación de la ruta de Notch (Ellisen et al., 1991, Cell 66:649-61). La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en células T en modelos de ratón genera de manera similar linfomas de células T que sugieren un papel causante (Robey et al., 1996, Cell

87:483-92; Pear et al., 1996, J. Exp. Med. 183:2283-91; Yan et al., 2001, Blood 98:3793-9; Bellavia et al., 2000, EMBO J. 19:3337-48). Recientemente, se ha encontrado que las mutaciones, inserciones y supresiones puntuales de NOTCH1 que producen señalización anormal de NOTCH1 están frecuentemente presentes tanto en leucemia linfoblástica aguda/linfoma de células T de niños y adultos (Pear & Aster, 2004, Curr. Opin. Hematol. 11:416-33).

La inserción frecuente del virus de tumor mamario de ratón tanto en el locus Notch1 y Notch4 en tumores mamarios y los resultantes fragmentos activados de proteína Notch implicó primero la señalización de Notch en el cáncer de mama (Gallahan & Callahan, 1987, J. Virol. 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Politi et al., 2004, Semin. Cancer Biol. 14:341-7). Estudios adicionales en ratones transgénicos han confirmado un papel para Notch en la ramificación ductal durante el desarrollo normal de la glándula mamaria, y una forma constitutivamente activa de Notch4 en células epiteliales mamarias que inhibe la diferenciación epitelial y da por resultado tumorigénesis (Jhappan et al., 1992, Genes & Dev. 6:345-5; Gallahan et al., 1996, Cancer Res. 56:1775-85; Smith et al., 1995, Cell Growth Differ. 6:563-77; Soriano et al., 2000, Int. J. Cancer 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, Dev. Biol. 196:204-17; Politi et al., 2004, Semin. Cancer Biol. 14:341-7). Actualmente, la

evidencia de un papel de Notch en cáncer de mama humano se limita a la expresión de receptores de Notch en carcinomas de mama y su correlación con el resultado clínico (Weijzen et al., 2002, Nat. Med. 8:979-86; Parr et al., 2004, Int. J. Mol. Med. 14:779-86). Adicionalmente, se ha observado la sobreexpresión de la ruta de Notch en cánceres cervicales (Zagouras et al., 1995, PNAS 92:6414-8), carcinoma de células renales (Rae et al., 2000, Int. J. Cancer 88:726-32), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4), cánceres endometriales (Suzuki et al., 2004, Int. J. Oncol. 17:1131-9), y neuroblastomas (van Limpt et al., 2000, Med. Pediatr. Oncol. 35:554-8) indicativo de un papel potencial de Notch en el desarrollo de varios neoplasmas. De manera interesante, la señalización de Notch puede jugar un papel en el mantenimiento del estado indiferenciado de células neoplásticas mutantes de Apc del colon (van Es & Clevers, 2005, Trends Mol. Med. 11:496-502).

La ruta de Notch también está comprendida en múltiples aspectos del desarrollo vascular que incluyen proliferación, migración, diferenciación de músculo liso, angiogénesis y diferenciación arterial-venosa (Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). Por ejemplo, las mutaciones nulas homocigotas en Notch-1/4 y Dentado-1 así como pérdida heterocigota de Dll4 da por resultado varios

defectos aunque variables en el desarrollo arterial y vascularización del saco vitelino. Adicionalmente, los embriones de ratones hipomórficos de Notch 2 deficientes de Dll1 muestran hemorragia que probablemente resulta de un desarrollo pobre de estructuras vasculares (Gale et al., 2004, PNAS, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, Genes Dev. 14:1343-52; Xue et al., 1999, Hum. Mol. Genet. 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, Nature 386:717-21; McCright et al., 2001, Dev. 128:491-502). En humanos, las mutaciones en DENTAD01 se asocian con síndrome de Alagille, un trastorno de desarrollo que incluye defectos vasculares, y las mutaciones en NOTCH3 son responsables de demencia vascular heredada (CADASIL) en la cual es defectuosa la homeostasis de los vasos (Joutel et al., 1996, Nature 383:707-10).

La identificación de DLL4 como se expresa en células madre de cáncer en comparación a epitelio normal de mama sugiere la selección como objetivo de la ruta de Notch para eliminar no sólo la mayoría de las células no tumorigénicas de cáncer, sino también las células tumorigénicas responsables de la formación y reincidencia de tumores sólidos. Adicionalmente, debido al papel prominente de la angiogénesis en la formación y mantenimiento de tumores, la selección como objetivo de la ruta de Notch mediante anticuerpos contra DLL4 también puede inhibir de manera efectiva la angiogénesis, privando a un cáncer de nutrientes y contribuyendo a su

eliminación.

De esta manera, la presente invención proporciona un marcador de células madre de cáncer, la expresión del cual se puede analizar para diagnosticar o monitorizar una enfermedad asociada con cáncer. En algunas modalidades, la expresión de un marcador de células madre de cáncer se determina por la expresión de polinucleótidos tal como, por ejemplo, ARNm que codifica para el marcador de células madre de cáncer. El polinucleótido se puede detectar y cuantificar por cualquiera de varios medios bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. En algunas modalidades, el ARNm que codifica para un marcador de células madre de cáncer se detecta por hibridación in situ de secciones de tejido de, por ejemplo, una biopsia de paciente. En algunas modalidades, se aísla ARN de un tejido y se detecta por ejemplo por transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, o microarreglos. Por ejemplo, se puede extraer el ARN total de una muestra de tejido y los cebadores que hibridizan y amplifican de manera específica un marcador de células madre de cáncer se puede usar para detectar la expresión de un polinucleótido de marcador de células madre de cáncer usando RT-PCR.

En ciertas modalidades, la expresión de un marcador de células madre de cáncer se puede determinar por detección del polipéptido correspondiente. El polipéptido se puede detectar y cuantificar por cualquiera de varios medios bien

209

conocidos por aquellos expertos en la técnica. En algunas modalidades, un polipéptido de marcador de células madre de cáncer se detecta usando métodos bioquímicos analíticos tal como por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) o cromatografía de capa delgada (TLC). El polipéptido aislada también se puede secuenciar de manera a técnica normales. En algunas modalidades, se detecta una proteína marcadora de células madre de cáncer con anticuerpos formulados contra la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica en secciones de tejido. De manera alternativa, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer puede detectar la expresión usando, por ejemplo, ELISA, FACS, transferencia Western, inmunoprecipitación o microarreglos de proteína. Por ejemplo, se pueden aislar células madre de cáncer de una biopsia de paciente y se detecta la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer con anticuerpos fluorescentemente marcados usando FACS. En otro método, las células que expresan un marcador de células madre de cáncer se pueden detectar *in vivo* usando anticuerpos marcados en un sistema típico de formación de imágenes. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con isótopos paramagnéticos se pueden usar para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

En algunas modalidades de la presente invención, un

ensayo de diagnóstico comprende determinar la expresión o no de un marcador de células madre de cáncer en células de tumor usando, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación in situ, o RT-PCR. En otras modalidades, un ensayo de diagnóstico
5 comprende determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer usando, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa. En algunas modalidades, un ensayo de diagnóstico comprende además determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer en
10 comparación a un tejido de control tal como por ejemplo, epitelio normal.

La detección de la expresión de un marcador de células madre de cáncer entonces se puede usar para proporcionar una prognosis y seleccionar una terapia. Una
15 prognosis se puede basar en lo que indique cualquier expresión conocida de riesgo de un marcador de células madre de cáncer. Adicionalmente, se puede usar la detección de un marcador de células madre de cáncer para seleccionar una terapia apropiada que incluye, por ejemplo, tratamiento con anticuerpos contra
20 la proteína marcadora, detectada, de células madre de cáncer. En ciertas modalidades, el anticuerpo se une de manera específica al dominio extracelular de una proteína marcadora de células madre de cáncer tal como el ligando de receptor de Notch, DLL4.

25 En el contexto de la presente invención, un

anticuerpo adecuado es un agente que puede tener uno o más de los siguientes efectos, por ejemplo: interferir con la expresión de un marcador de células madre de cáncer; interferir con la activación de una ruta de traducción de señales de células madre de cáncer, por ejemplo al inhibir estéricamente interacciones entre un marcador de células madre de cáncer y su ligando, receptor o co-receptores; activar una ruta de traducción de señales de células madre de cáncer, por ejemplo al actuar como un ligando o al promover la unión de un ligando endógeno; o unión a un marcador de células madre de cáncer y al inhibir la proliferación de células tumorales.

En ciertas modalidades, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer actúan de manera extracelular para modular la función de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En algunas modalidades, la unión extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede inhibir la señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer, por ejemplo al inhibir la activación intrínseca (por ejemplo, la actividad de cinasa) de un marcador de células madre de cáncer y/o al inhibir estéricamente la interacción, por ejemplo, de un marcador de células madre de cáncer con su ligando, con su receptor, con un co-receptor, o con la matriz extracelular. En algunas modalidades, la unión extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede reducir la expresión

en superficie celular de un marcador de células madre de
cáncer tal como por ejemplo, por internalización de una
proteína marcadora de células madre de cáncer o al disminuir
el tráfico de superficie celular de un marcador de células
5 madre de cáncer. En algunas modalidades, la unión
extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células
madre de cáncer puede promover la señalización de una proteína
marcadora de células madre de cáncer por ejemplo al actuar
como un ligando de señuelo o al incrementar la unión a
10 ligando.

En ciertas modalidades, los anticuerpos contra un
marcador de células madre de cáncer se unen a una proteína
marcadora de células madre de cáncer y tienen uno o más de los
siguientes efectos: inhiben la proliferación de células de
15 tumor, activan la muerte celular de células de tumor,
promueven la diferenciación de células de tumor en un tipo
celular menos tumorigénico, o impiden la metástasis de las
células de tumor. En ciertas modalidades, los anticuerpos
contra un marcador de células madre de cáncer activan la
20 muerte celular mediante una toxina conjugada, agente
quimioterapéutico, radioisótopo, u otro agente. Por ejemplo,
un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se
conjugua a una toxina que se activa en células de tumor que
expresan el marcador de células madre de cáncer por
25 internalización de proteína.

En ciertas modalidades, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer media la muerte celular de una célula que expresa la proteína marcadora de células madre de cáncer mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC comprende la lisis celular por células efectoras que reconocen la porción Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos de tejido, granulocitos y eosinófilos, por ejemplo, tienen receptores de Fc y pueden mediar la citólisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497).

En ciertas modalidades, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer activan la muerte celular de una célula que expresa una proteína marcadora de células madre de cáncer al activar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). La CDC comprende la unión del complemento del suero a la porción Fc de un anticuerpo y la activación subsiguiente de la cascada de proteínas de complemento, que da por resultado el daño a la membrana celular y la eventual muerte celular. Se conoce que la actividad biológica de los anticuerpos se determina, en un mayor grado, por los dominios constantes o región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue y Benacerraf, Textbook of Immunology, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases difieren a este respecto, de modo que los anticuerpos de la misma subclase, pero de diferente especie.

24

De los anticuerpos humanos, la IgM es la clase más eficiente de anticuerpos para unión a complemento, seguido por IgG1, IgG3, e IgG2 en tanto que IgG4 parece bastante deficiente en activar la cascada de complemento (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). De acuerdo a la presente invención, se preparan anticuerpos de estas clases que tienen la actividad biológica deseada.

Se puede valorar la capacidad de cualquier anticuerpo particular contra una célula madre de cáncer para mediar la lisis de la célula objetivo por activación de complemento y/o ADCC. Las células de interés se cultivan y marcan *in vitro*; se adiciona el anticuerpo al cultivo celular en combinación con ya sea complemento de suero o células inmunitarias que se pueden activar por los complejos de antígeno-anticuerpo. Se detecta la citólisis de las células objetivo, por ejemplo, por la liberación de la marca de las células lisadas. En realidad, se pueden examinar los anticuerpos usando el propio suero del paciente como una fuente de células inmunitarias y/o complemento. El anticuerpo que es capaz de activar el complemento o mediar la ADCC en la prueba *in vitro* entonces se puede usar terapéuticamente en ese paciente particular.

En ciertas modalidades, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer pueden activar la muerte

25

celular inhibiendo la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes y es un proceso fundamental requerido para el crecimiento normal, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, curación de heridas, y en respuesta a la ovulación. El crecimiento de tumores sólidos mayores de 1-2 mm² también requiere la angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno sin que mueran las células tumorales. En ciertas modalidades, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer selecciona como objetivo las células vasculares que expresan el marcador de células madre de cáncer que incluye, por ejemplo, células endoteliales, células de músculo liso, o componentes de la matriz extracelular requeridos para el montaje vascular. En ciertas modalidades, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer inhibe la señalización del factor de crecimiento requerida por el reclutamiento, montaje, mantenimiento o supervivencia de células vasculares.

Los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer encuentran uso en los métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención se usan para detectar la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer en muestras biológicas tal como por ejemplo, una biopsia de tejido del paciente, efusión pleural, o muestra

216

sanguínea. Las biopsias de tejido se pueden seccionar y se puede detectar la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Además, se pueden aislar células individuales de una muestra, y la expresión de la proteína se detecta en células fijas o vivas por análisis de FACS. En ciertas modalidades, se pueden usar anticuerpos en arreglos de proteína para detectar la expresión de un marcador de células madre de cáncer, por ejemplo, en células de tumor, en lisados celulares, o en otras muestras de proteína. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales al poner en contacto los anticuerpos con células tumorales en ensayos basados en células *in vitro*, modelos de animales *in vivo*, etc. En ciertas modalidades, los anticuerpos se usan para tratar cáncer en un paciente al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer.

Los anticuerpos de la invención se pueden preparar por cualquier medio convencional conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos policlonales al inmunizar un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, mono, etc.) por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.), opcionalmente conjugado a

hemocianina de lapa (KLH), albúmina de suero, etc., diluido en soporte salina estéril y combinado con un adyuvante (por ejemplo, Adyuvante Completo o Incompleto de Freund) para formar una emulsión estable. El anticuerpo policlonal entonces se recupera de la sangre, ascitis y similares, de un animal inmunizado de este modo. La sangre recolectada se formula, y el suero se decanta, se clarifica por centrifugación, y se valora para el título del anticuerpo. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar de suero o ascitis de acuerdo a métodos normales conocidos en la técnica que incluye cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma, tal como aquellos descritos por Kohler y Milestein (1975) Nature 256:495. Usando el método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza como se describe anteriormente para provocar la producción por linfocitos de anticuerpos que se unirán de manera específica a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y fusionan con una línea adecuada de células de mieloma usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que entonces se pueden seleccionar de linfocitos no fusionados y células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos

monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido como se determina por inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o por un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA); ensayo inmunosorbente 5 enlazado a enzimas (ELISA)) entonces se pueden propagar ya sea por cultivo *in vitro* usando métodos normales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales entonces se pueden purificar del 10 medio de cultivo o fluido de ascitis como se describe anteriormente para los anticuerpos policlonales.

De manera alternativa, también se pueden elaborar anticuerpos monoclonales usando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente de los Estados Unidos número 15 4,816.576. Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tal como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican de manera específica los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, 20 y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican para las cadenas pesada y ligera entonces se clonan en vectores adecuados de expresión, que cuando se transfectan en células hospedadoras tal como células de E. coli, células COS 25 simiescas, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células

219

de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células hospedadoras. También, los anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada se pueden aislar de bibliotecas de visualización en fago que expresan CDR de la especie deseada como se describe (McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

10 Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonal se pueden modificar adicionalmente de varias maneras diferentes usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas modalidades, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada por ejemplo
15 de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden sustituir 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico, o 2) para un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas modalidades, las regiones constantes se truncan o
20 remueven para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Se puede usar la mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

25 En algunas modalidades de la presente invención, el

anticuerpo monoclonal contra un marcador de células madre de
cáncer es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos
humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas
de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) dentro de las
5 regiones variables. Estos anticuerpos se usan
terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las
respuestas de HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se
administran a un sujeto humano. En la práctica, típicamente
los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos con un
10 mínimo de secuencias no humanas. Un anticuerpo humano es un
anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene
una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo
producido por un humano.

Los anticuerpos humanizados se pueden producir
15 usando varias técnicas bien conocidas. Un anticuerpo se puede
humanizar al sustituir las CDR de un anticuerpo humano con
aquéllas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata,
conejo, hámster, etc.), que tiene la especificidad, afinidad y
capacidad deseadas siguiendo los métodos de (Jones et al.,
20 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature,
332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536).
El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por
la sustitución del residuo adicional ya sea en la región de
soporte, humana, variable y/o dentro de los residuos no
25 humanos reflejados para refinar y optimizar la especificidad,

afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

La elección de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera humana que se van a usar en la elaboración de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo al método de "mejor ajuste", la secuencia de dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina contra la biblioteca completa de secuencias conocidas de aminoácidos de dominio variable humano. De esta manera, en ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos, humana, que es más homóloga a aquélla del anticuerpo de roedor del cual se toman las CDR se usa como la región de soporte, humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., 1993, J. Immunol., 151:2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol., 196:901). Otro método usa una FR particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas y se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., 1992, PNAS, 89; 4285; Presta et al., 1993, J. Immunol., 151:2623). En ciertas modalidades, se usa una combinación de métodos para recolectar la FR variable humana para uso en la generación de anticuerpos humanizados.

Adicionalmente, se entiende que los anticuerpos (por ejemplo, de roedor) que se van a humanizar deben retener alta afinidad para el antígeno así como otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, se pueden

Solicitud de Patente de Invención

09/31240

2/2

preparar anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de la secuencia parental del anticuerpo de roedor que se va a humanizar y las varias secuencias humanizantes candidatas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Se pueden usar programas de computadora para ilustrar y presentar probables estructuras tridimensionales, conformacionales de secuencias seleccionadas de anticuerpos candidatos. El uso de estos modelos permite el análisis del probable papel de los residuos en la función del anticuerpo que se va a humanizar, es decir, el análisis de los residuos que tienen influencia en la capacidad del anticuerpo candidato para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar residuos de FR y combinar al anticuerpo de origen al anticuerpo humanizado receptor de modo que se logren las características deseadas del anticuerpo. En general, los residuos en las CDR de la región de determinación de antígeno (o región hipervariable) se retienen del anticuerpo parental (por ejemplo, el anticuerpo de roedor con las propiedades deseadas de unión a antígeno) en el anticuerpo humanizado para la unión a antígeno. En ciertas modalidades, al menos un residuo adicional dentro de la FR variable se retiene del anticuerpo parental en el anticuerpo humanizado. En ciertas modalidades, se retienen hasta seis residuos adicionales dentro de la FR variable del anticuerpo parental en el

anticuerpo humanizado.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de inmunoglobulina se designan Hx y Lx, respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido de acuerdo al esquema de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1987, 1991. Kabat lista muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subgrupo, y lista el aminoácido que se presenta más comúnmente para cada posición de residuo en ese subgrupo para generar una secuencia de consenso. Kabat usa un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia listada, y este método para asignar números de residuo ha llegado a ser estándar en el campo. El esquema de Kabat es extendible a otros anticuerpos no incluidos en su compendio al alinear el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. El uso del sistema de numeración de Kabat identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición de L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a una posición L50 de aminoácido de un anticuerpo de ratón. Además, se pueden alinear de forma única cualesquiera secuencias de anticuerpo, por ejemplo para determinar el por ciento de identidad, al usar el sistema de

294

numeración de Kabat de modo que cada aminoácido en una secuencia de anticuerpos se alinea con el aminoácido en la otra secuencia que tiene el mismo número de Kabat. Después de la alineación, si se están comparando una región de anticuerpo (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre el sujeto y las regiones del anticuerpo de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en el sujeto como en la región de anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con las separaciones no contadas, multiplicado por 100 para convertir a porcentaje.

El Ejemplo 1 posterior describe la producción de anticuerpos anti-DLL4 humanizados de ejemplo que se unen de manera específica a DLL4 humano, un marcador de células madre de cáncer de la presente descripción (21M18 H9L2, ATCC depósito número PTA-8427 y 21M18 H7L2, ATCC depósito número PTA-8425, depositado el 10 de mayo de 2007; (American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 EUA)). En ciertas modalidades, los anticuerpos humanizados comprenden regiones no humanas de determinación de antígeno derivadas del anticuerpo monoclonal murino 21M18. De manera específica, en ciertas modalidades, una o más de las CDR de cadena pesada del anticuerpo parental de roedor CDR1

(SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4, que varían en la posición de Kabat 52a), y CDR3 (SEQ ID NO: 5) se retienen en el anticuerpo 21M18 humanizado. En ciertas modalidades, una o más de las CDR de cadena ligera del anticuerpo parental de roedor, CDR1 (SEQ ID NO: 9, CDR2 (SEQ ID NO: 10), y CDR3 (SEQ ID NO: 11), se retienen en el anticuerpo 21M18 humanizado. En ciertas modalidades, los anticuerpos humanizados comprenden adicionalmente al menos una sustitución de FR dentro de ya sea la región variable humana de cadena pesada o ligera.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde el anticuerpo afecta el crecimiento de un tumor. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de IgG intacto. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de IgG₂ intacto. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado es un fragmento de anticuerpo. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado es un fragmento de Fab.

En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado de la presente invención comprende una región variable (V_H) de cadena pesada que comprende una región de determinación de antígeno no humana y una región de soporte, variable, humana.

En ciertas modalidades, la región de determinación de antígeno no humana comprende regiones de determinación de complementariedad (CDR) de origen de roedor. En ciertas modalidades, la región de determinación de antígeno no humana comprende CDR de un anticuerpo de ratón. En ciertas modalidades, las CDR de roedor se derivan del anticuerpo 21M18 monoclonal, en donde 21M18 comprende una región variable de cadena pesada designada SEQ ID NO: 6. En ciertas modalidades, en donde el anticuerpo humanizado comprende una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos de (a) CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4), y CDR3 (SEQ ID NO: 5); o (b) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8.

En ciertas modalidades, la región de soporte, variable, de cadena pesada, humana comprende secuencias humanas expresadas. En ciertas modalidades, está sustituido al menos un residuo en la región de soporte, variable, humana. En ciertas modalidades, al menos un residuo en la región de soporte, variable, de cadena pesada, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 16, 20, 27, 28, 38 y 48 en base al sistema de numeración de Kabat. En ciertas modalidades, las posiciones 16, 20, 27, 28, 38 y 48 están sustituidas en base al sistema de numeración de Kabat. En ciertas modalidades, al menos un residuo en la región de soporte, variable, humana está sustituida con un residuo que

ocupa la posición correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

En ciertas modalidades, la región de soporte, variable, de cadena pesada, humana comprende IGH(V)1-18. En
5 ciertas modalidades, está sustituido al menos un residuo en la región de soporte, variable, humana. En ciertas modalidades, al menos un residuo en la región de soporte, variable, de cadena pesada, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 20H, 28H, 38H, 48H, y 69H en base al
10 sistema de numeración de Kabat. En ciertas modalidades, están sustituidas las posiciones 20H, 28H, 38H, 48H, y 69H en base al sistema de numeración de Kabat. En ciertas modalidades, al menos un residuo en la región de soporte, variable, humana está sustituido con un residuo que ocupa la posición
15 correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado de la presente invención comprende una región variable (V_L) de cadena ligera que comprende una región de determinación de
20 antígeno, no humana, y una región de soporte, variable, humana. En ciertas modalidades, la región de determinación de antígeno, no humana, comprende las CDR de origen de roedor. En ciertas modalidades, la región de determinación de antígeno, no humana comprende las CDR de un anticuerpo de
25 ratón. En ciertas modalidades, las CDR se derivan del

228

anticuerpo monoclonal 21M18, en donde 21M18 comprende una región V_L designada SEQ ID NO: 12. En ciertas modalidades, la región V_L comprende una secuencia de aminoácidos de (a) CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10): o CDR3 (SEQ ID NO: 11);
5 o (b) SEQ ID NO: 12.

En ciertas modalidades, la región de soporte, variable, de cadena ligera, humana comprende IGK(V)4-1. En ciertas modalidades, se sustituye al menos un residuo en la región de soporte, variable, de cadena ligera, humana. En
10 ciertas modalidades, al menos un residuo en la región de soporte, variable, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 22L y 36L en base al sistema de numeración de Kabat. En ciertas modalidades, las posiciones 22L y 36L se sustituyen en base al sistema de numeración de
15 Kabat. En ciertas modalidades, al menos un residuo de la región de soporte, variable, humana se sustituye con un residuo que ocupa la posición correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

20 En ciertas modalidades, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que compite con el anticuerpo 21M18 para unión específica a DLL4 humano, en donde el anticuerpo 21M18 comprende: (a) una cadena pesada con una región variable designada SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8; y (b)
25 una cadena ligera con una región variable designada SEQ ID NO:

12. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado que se une específicamente a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y el dominio DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8 y la región variable de cadena ligera tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada tiene al menos 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8 y la región variable de cadena ligera tiene al menos 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 12.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), y DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde el anticuerpo

230



231



comprende una región V_H que comprende una región de determinación de antígeno, no humana, que codifica para CDR1 (SEQ ID NO: 1); CDR2 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4), y CDR3 (SEQ ID NO: 5) y una región de soporte, variable, humana que codifica para IGH(V)1-18. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y DSL humana (SEQ ID NO: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de: (a) una molécula de polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8; y (b) una molécula de polinucleótido que hibridiza al complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), y DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de (a) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 15; y (b) una molécula de polinucleótido que hibridiza el complemento de la molécula de polinucleótido

de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera

5 específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), y DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde el anticuerpo comprende una región V_L que comprende una región de determinación de antígeno, no humana, que codifica para CDR1

10 (SEQ ID NO: 9); CDR2 (SEQ ID NO: 10); y CDR3 (SEQ ID NO: 11) y una región de soporte, variable, humana que codifica para IGK(V)4-1. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera

15 específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y DSL humana (SEQ ID NO: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de: (a) una molécula de polinucleótido que codifica para la secuencia

20 de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y (b) una molécula de polinucleótido que hibridiza al complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona una molécula aislada de polinucleótido

25 que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de

manera específica a un epítopo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), y DSL humano (SEQ ID NO: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de (a) SEQ
5 ID NO: 16 y (b) una molécula de polinucleótido que hibridiza el complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa.

En ciertas modalidades, se proporciona un vector de expresión que comprende una molécula aislada de polinucleótido
10 de la presente invención. En ciertas modalidades, se proporciona una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende una molécula aislada de polinucleótido de la presente invención.

En ciertas modalidades, la presente invención
15 proporciona un método para tratar un cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo humanizado de la presente descripción. En ciertas modalidades, el cáncer comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de
20 pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata, o cáncer de cabeza y cuello.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un kit que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en donde la composición
25 comprende un anticuerpo humanizado de la presente descripción,

y comprende además una inserción de paquete que indica que la composición se puede usar para tratar cáncer.

Además, se pueden preparar directamente anticuerpos completamente humanos usando varias técnicas bien conocidas.

5 Se pueden generar linfocitos B humanos, inmortalizados, inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo (ver, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 10 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-94; y la patente de los Estados Unidos número 5,750,373). También, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca de fagos, en donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, 15 *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar en ratones transgénicos que contienen locus de inmunoglobulinas humanas que son capaces, en la inmunización, 20 de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Este planteamiento se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

25 Esta invención también abarca anticuerpos

biespecíficos que reconocen de manera específica un marcador de células madre de cáncer. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente a al menos dos epítomos diferentes. Los

5 epítomos diferentes pueden estar ya sea dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido de marcador de células madre de cáncer) o en diferentes moléculas tal que por ejemplo, los anticuerpos puedan tanto reconocer de manera específica como unirse a un marcador de células madre de

10 cáncer así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora en un leucocito tal como un receptor de células T (por ejemplo, CD3) o receptor de Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe en detalle más adelante. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos

15 o fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos diferentes epítomos, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido de la invención. De manera alternativa, se puede combinar un brazo anti-antigénico de una

20 molécula de inmunoglobulina con un brazo que se une a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores de Fc para IgG para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno

25 particular. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos

para dirigir los agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelador de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Se conocen técnicas para elaborar anticuerpos biespecíficos (Millstein et al., 1993, *Nature* 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science* 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.* 152:5368; y la patente de los Estados Unidos número 5,731,168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991)).

En ciertas modalidades, se proporciona un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, para incrementar la penetración en el tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo: tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). En ciertas modalidades, se producen recombinantemente fragmentos de anticuerpo. Se pueden expresar todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, y

scFv en y segregar a partir de *E. coli* u otras células
hospedadoras, permitiendo de esta manera la producción de
grandes cantidades de estos fragmentos. Estos fragmentos de
anticuerpo también se pueden aislar de las bibliotecas de
5 fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Los fragmentos
de anticuerpo también pueden ser anticuerpos lineales como se
describe en la patente de los Estados Unidos número 5,641,870,
por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.
Para el experto en la técnica serán evidentes otras técnicas
10 para la producción de fragmentos de anticuerpo.

De acuerdo a la presente invención, se pueden
adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena
individual específicos para un polipéptido de la invención
(ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos número
15 4,946,778). Además, se pueden adaptar métodos para la
construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse, et al.,
Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación
rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con
especificidad deseada para el ligando de receptor de Notch,
20 DLL4, o derivados, fragmentos, u homólogos del mismo. Se
pueden producir fragmentos de anticuerpo que contienen los
idiotipos a un polipéptido de la invención, por técnicas
conocidas que incluyen, pero no se limitan a: (a) un fragmento
F(ab')₂ producido por digestión con pepsina de una molécula de
25 anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado al reducir los

puentes de disulfuro de un fragmento $F(ab')_2$, (c) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.

Adicionalmente, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo a fin de incrementar su vida media en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, por incorporación de un epítipo de unión a receptor de salvamento en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o al incorporar el epítipo en una marca de péptido que entonces se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte intermedia (por ejemplo, por síntesis peptídica o ADN).

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células indeseadas (patente de los Estados Unidos número 4,676,980). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluyendo aquellos que comprenden agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o al formar un enlace de tioéter.

Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito

2/2

31240

gmo

incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Para los propósitos de la presente invención, se debe apreciar que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptido de DLL4 humano. A este respecto, la región variable puede comprender o se deriva de cualquier tipo de mamífero que se pueda inducir para montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado asociado a tumor. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o lupino. En algunas modalidades, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas.

En otras modalidades, las regiones variables de anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente no humana) se pueden manejar o adaptar de manera específica para mejorar las propiedades de unión o para reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, se pueden humanizar regiones variables útiles en la presente invención o se pueden alterar de otro modo a través de la inclusión de secuencias importadas de aminoácidos.

Los dominios variables tanto en las cadenas pesadas como ligeras se alteran por reemplazo al menos parcial de una o más CDR, y si es necesario, por reemplazo parcial de la

región de soporte y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o aún subclase como el anticuerpo del cual se derivan las regiones de soporte, se contempla que las CDR se derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y de manera preferente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, sólo puede ser necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de los Estados Unidos números 5,585,089, 5,693,761 y 5,693,762, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la técnica, ya sea al llevar a cabo experimentación de rutina o por prueba de ensayo y error como obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

No obstante las alteraciones de la región variable, aquellos expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos modificados de esta invención comprenderán anticuerpos, o fragmentos inmunorreactivos de los mismos, en los cuales al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han suprimido o alterado de otro modo para proporcionar características bioquímicas deseadas tal como localización incrementada de tumor o vida media reducida en

242

suero en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. En algunas modalidades, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una
5 región constante humana. Las modificaciones en la región constante compatibles con esta invención comprenden adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en la presente pueden comprender alteraciones o modificaciones
10 a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En algunas modalidades de la invención, se contemplan regiones constantes modificadas en donde se suprimen parcial o completamente uno o más dominios. En algunas modalidades, los
15 anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes suprimidas de dominio en donde el dominio CH2 completo se ha removido (construcciones Δ CH2). En algunas modalidades, el dominio omitido de región constante se reemplazará por un separador corto de aminoácidos (por
20 ejemplo, 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular impartida típicamente por la región constante ausente.

Además de su configuración, se conoce en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por
25 ejemplo, la unión del componente C1 de complemento a

MB

anticuerpos activa el sistema de complemento. La activación de complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación de complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar comprendida en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Adicionalmente, los anticuerpos se unen a células mediante la región Fc, con un sitio de receptor de Fc en la región Fc de anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Hay varios receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares activa varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la engullición y destrucción de partículas revestidas con anticuerpo, depuración de complejos inmunitarios, lisis de células objetivo revestidas con anticuerpo por células aniquiladoras (llamada citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, o ADCC), delegación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina. Aunque se han estudiado en cierto grado varios receptores de Fc y sitios de receptores, aún hay mucho que se desconoce acerca de su ubicación, estructura y funcionamiento.

En tanto que no se limita el alcance de la presente

invención, se cree que los anticuerpos que comprenden regiones constantes modificadas como se describe en la presente proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor de Fc del anticuerpo modificado en circulación, incrementando de este modo la localización de tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de región constante, consistentes con esta invención, moderen la unión de complemento y reduzcan de este modo la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Se pueden usar aún otras modificaciones de la región constante para eliminar enlaces de disulfuro o porciones de oligosacáridos que permitan la localización mejorada debido a especificidad incrementada de antígeno o flexibilidad incrementada de anticuerpo. De manera similar, se pueden hacer fácilmente modificaciones a la región constante de acuerdo con esta invención usando técnicas de ingeniería molecular o bioquímica bien conocidas, dentro del alcance del experto en la técnica.

Se señalará que los anticuerpos modificados se pueden manejar para fusionar directamente el dominio CH3 a la región de articulación de los anticuerpos modificados respectivos. En otras construcciones, puede ser deseable

proporcionar un separador peptídico entre la región de articulación y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, se pueden expresar construcciones compatibles en donde el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región de articulación con un separador de 5-20 aminoácidos. Este separador se puede adicionar, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres o accesibles o que permanezca flexible la región de articulación. Sin embargo, se debe señalar que los separadores de aminoácidos pueden probar, en algunos casos, ser inmunogénicos y producir una respuesta inmunitaria indeseada contra la construcción. Por consiguiente, cualquier separador adicionado a la construcción es relativamente no inmunogénico o aún se omite conjuntamente si se pueden mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la supresión de los dominios enteros de región constante, se apreciará que los anticuerpos de la presente invención se pueden proporcionar por la supresión o sustitución parcial de unos pocos aminoácidos o aún un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc e incrementar de este modo la localización del tumor. De manera

246

similar, puede ser deseable suprimir simplemente esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión a CLQ de complemento) que se va a modular. Estas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) en tanto que dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el presente dominio de región constante. Además, como se sugiere anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos se pueden modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejora el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio conservado de unión (por ejemplo, unión de Fc) en tanto que se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Ciertas modalidades pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar características deseables tal como función efectora o proporcionar más unión a carbohidratos o citotoxina. En estas modalidades, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios seleccionados de región constante.

La presente invención abarca adicionalmente variantes equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de

247

anticuerpo de los mismos, expuestos en la presente. Por ejemplo, éstos pueden contener mutaciones de sustituciones conservadoras, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general tal como por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, o un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutral por otro aminoácido neutral. Lo que se propone por una sustitución conservadora de aminoácido es bien conocido en la técnica.

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado o un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen los agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores de crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fungoideo, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), isótopos radioactivos (por ejemplo, radioconjugados), etc. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de estos inmunoconjugados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina de

248

difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricino, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. En algunas modalidades, los anticuerpos se pueden conjugar a radiosiótopos tal como ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , y ^{188}Re usando cualquiera de varios queladores bien conocidos o marcación directa. En otras modalidades, las composiciones descritas pueden comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o linfoquinas tal como interferón. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se elaboran usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína, bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridiliditiol)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoéster (tal como dimetil-adipimidato-HCL), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutareldehído), compuestos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoyl)-hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los conjugados de un anticuerpo o una o más toxinas de molécula

249

pequeña, tal como una caliqueamicina, maitansinósidos, un tricoteno, y CC1065, y derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se pueden usar. En algunas modalidades, los anticuerpos modificados se pueden volver
5 complejos con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos) en donde la molécula resultante se une tanto a la célula neoplástica como a una célula efectora tal como una célula T.

A pesar de cómo se obtienen las cantidades útiles,
10 los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en cualquiera de varias formas conjugadas (es decir, un inmunoconjugado) o no conjugado. De manera alternativa, los anticuerpos de esta invención se pueden usar en una forma no conjugada o "descubierta" para aparejar los mecanismos de
15 defensa natural del sujeto incluyendo la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para eliminar las células malignas. La selección de qué anticuerpo conjugado o no conjugado, modificado usar dependerá del tipo y etapa de
20 cáncer, uso del tratamiento adjunto (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y la condición del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica puede hacer fácilmente esta selección en vista de las enseñanzas en la presente.

25 Los anticuerpos de la presente invención se pueden

valorar para unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tal como análisis BIAcore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímico, transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de "intercalación", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. Estos ensayos son rutina y bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, la inmuno-especificidad de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se determina usando ELISA. Un ensayo de ELISA comprende preparar antígeno, revestir concavidades de una placa de microtítulo de 96 concavidades con el antígeno, adicionar el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer conjugado a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) a la concavidad, incubar durante un periodo de tiempo y detectar la

25

presencia del antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer no se conjuga a un compuesto detectable, sino en cambio se adiciona a la concavidad un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer. En algunas modalidades, en lugar de revestir la concavidad con el antígeno, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se puede revestir a la concavidad y se puede adicionar un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno a la concavidad revestida. Un experto en la técnica podrá reconocer los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York at 11.2.1).

La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno de marcador de células madre de cáncer y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno se puede determinar por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, con ^3H o ^{125}I), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en la presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado seguido por la detección del anticuerpo

252

unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer y las constantes de disociación de la unión se pueden determinar de los datos por análisis en gráfica scatchard. En algunas modalidades, se usa el análisis cinético de BIAcore para determinar las constantes de asociación y disociación de la unión de los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer. El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación de los anticuerpos de chips con antígenos inmovilizados de marcador de células madre de cáncer en su superficie.

En ciertas modalidades, la invención abarca polinucleótidos aislados que codifican para un polipéptido que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra DLL4 humano. De esta manera, el término "polinucleótido que codifica para un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye sólo secuencias codificantes para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes, adicionales. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN. ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético; y puede ser de doble hebra o de hebra individual, y si es de hebra individual puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (anti-sentido).

La presente invención se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la

presente que codifican, por ejemplo, para fragmentos, análogos y derivados. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica que se presenta de forma natural de polinucleótido o una variante que no se presenta de forma natural del polinucleótido. En ciertas modalidades, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica que se presenta de manera natural de la secuencia codificante de los polipéptidos descritos. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alterna de una secuencia de polinucleótido que tiene, por ejemplo, una sustitución, supresión o adición de uno o más nucleótidos, que no alteran sustancialmente la función del polipéptido codificado.

En ciertas modalidades, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionado al mismo cuadro de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedadora (por ejemplo, una secuencia guía que funciona como una secuencia secretoria para controlar el transporte de un polipéptido de las células. El polipéptido que tiene una secuencia guía es una preproteína y puede tener la secuencia guía escindida por la célula hospedadora para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para una proproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácido 5'

254

adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia, permanece una proteína madura activa.

5 En ciertas modalidades, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionado en el mismo cuadro de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora
10 puede ser una marca de hexa-histidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedador bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una marca de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de
15 hemaglutinina de influenza cuando se usa un hospedador de mamífero (por ejemplo, células COS-7).

 En ciertas modalidades, la presente invención proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos al menos 80 % idéntica, al menos
20 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, y en algunas modalidades, al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un polinucleótido que codifica para un anticuerpo que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra DLL4 humano.

25 Por un polinucleótido que tiene una secuencia de

VSS

nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia se propone que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia donde quiera entre estas posiciones terminales, interpuestas ya sea de manera individual entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

20 Como una materia práctica, si cualquier molécula particular de ácido nucleico es al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, y en algunas modalidades, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de referencia se puede determinar de manera
25 convencional usando programas conocidos de computadora tal

256

como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482 489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo a la presente invención, los parámetros se ajustan tal que el porcentaje de identidad se calcula sobre longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y que se permiten separaciones en la homología de hasta 5 % del número total en nucleótidos en la secuencia de referencia.

15 Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, en las regiones no codificantes, o en ambas. En algunas modalidades, las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones poco notorias, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas modalidades, las variantes de nucleótidos se producen por sustituciones poco notorias debido a la degeneración del código genético. Se pueden producir variantes de polinucleótido por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un

297

hospedador particular (cambiar codones en el ARNm humano a aquellos preferidos por un hospedador bacteriano tal como *E. coli*).

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser

5 polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, un fragmento del mismo, contra DLL4 humano. Se reconocerá en la técnica que se pueden variar algunas secuencias de aminoácido de la invención sin efecto significativo de la estructura o

10 función de la proteína. De esta manera, la invención incluye adicionalmente variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra proteína de DLL4 humano. Estos mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones,

15 repeticiones y sustituciones de tipo.

Los polipéptidos y análogos se pueden modificar adicionalmente para contener porciones químicas adicionales normalmente no parte de la proteína. Estas porciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, vida media

20 biológica o absorción de la proteína. Las porciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto lateral deseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una revisión de estas porciones en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

25 Los polipéptidos aislados descritos en la presente

258

se pueden producir por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Estos métodos varían desde métodos de síntesis directa de proteínas a construcción de una secuencia de ADN que codifica para secuencias aisladas de polipéptido y que expresan aquellas secuencias en un hospedador transformado, adecuado. En algunas modalidades, una secuencia de ADN se construye usando tecnología recombinante al aislar o sintetizar una secuencia de ADN que codifica para una proteína tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Ver, por ejemplo, Zoeller et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 81:5662-5066 (1984) y la patente de los Estados Unidos número 4,588,585.

En algunas modalidades, se construirá una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido de interés por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos se pueden diseñar en base a la secuencia de aminoácidos de polipéptido deseado y seleccionado aquellos codones que se favorecen en la célula hospedadora en la cual se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar métodos normales para sintetizar una secuencia aislada de polinucleótido que codifica para un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen retro-

254

traducido. Adicionalmente, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, se pueden sintetizar y luego ligar varios oligonucleótidos pequeños que
5 codifican para porciones del polipéptido deseado. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente salientes de 5' o 3' para montaje de complementariedad.

Una vez montadas (por síntesis, por mutagénesis dirigida al sitio o por otro método), las secuencias de
10 polinucleótido que codifican para un polipéptido aislado particular de interés e insertarán en un vector de expresión y se enlazarán de manera operativa a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un hospedador deseado. Se puede confirmar el montaje apropiado
15 por secuenciación de nucleótidos, por correlación de restricción, y por la expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador adecuado. Como es bien conocido en la técnica, a fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un hospedador, el gen se
20 debe enlazar de manera operativa a secuencias de control de expresión transduccional y transcripcional que son funcionales en el hospedador elegido de expresión.

Se usan vectores de expresión recombinante para amplificar y expresar ADN que codifica para fusiones de
25 polipéptido de marcador de células madre de cáncer. Los

vectores de expresión recombinante son construcciones replicables de ADN que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican para una fusión de polipéptido de marcador de células madre de cáncer o un análogo bioequivalente enlazado de manera operativa a elementos reguladores transduccionales o transcripcionales adecuados derivados de genes mamíferos, microbianos, virales o de insecto. Una unidad transcripcional comprende en general un montaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o intensificadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en el ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de terminación e iniciación de transcripción y traducción, como se describe en detalle más adelante. Estos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Se puede incorporar adicionalmente la capacidad para replicarse en un hospedador, usualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. Se enlazan de forma operativa regiones de ADN que se relacionan funcionalmente entre si. Por ejemplo, se enlaza de manera operativa ADN para un péptido de señal (guía secretora) al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la selección del polipéptido; se enlaza de manera

261

operativa un promotor a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o se enlaza de manera operativa un sitio de unión a ribosoma a una secuencia codificante si se coloca para permitir la traducción. En general, medios operativamente enlazados contiguos y en el cado de guías secretorias medios contiguos y en cuadro de lectura. Los elementos estructurales incluidos para el uso en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia guía que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedadora. De manera alternativa, donde la proteína recombinante se expresa sin una secuencia guía o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo se puede escindir opcionalmente de manera subsiguiente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de expresión y del vector de expresión dependerá de la elección del hospedador. Se pueden emplear una amplia variedad de combinaciones de hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucarióticos, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores útiles de expresión para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tal como plásmidos de Escherichia coli, incluyendo

262

pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de intervalo más amplio de hospedadores, tal como M13 y fagos filamentosos de ADN de hebra individual.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer, incluye procariotas, levadura, células eucariotas de insecto o superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, E. coli o bacilli. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe más adelante. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células. Los vectores apropiados de clonación y expresión para el uso con hospedadores celulares bacterianos, fungoideos, de levadura y mamíferos se describen por Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), la descripción pertinente de lo cual se incorpora de este modo como referencia.

También se emplean de manera ventajosa varios sistemas de cultivo de células de insecto o de mamífero para expresar la proteína recombinante. La expresión de las proteínas recombinantes en células mamíferas se puede realizar debido a que estas proteínas en general se pliegan de forma correcta, se modifican de manera apropiada y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras

mamíferas adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado, que incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3 de ovario de hámster Chino (CHO), líneas de células HeLa y BHK. Los vectores de expresión mamífera pueden comprender elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor e intensificador adecuados enlazados al gen que se va a expresar, y otras secuencias no transcritas de flanco 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitios necesarios de unión a ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios de donador y aceptador de empalme, y secuencias de terminación transcripcional. Los sistemas de Baculovirus para producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan por Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Las proteínas producidas por un hospedador transformado se pueden purificar de acuerdo a cualquier método adecuado. Los métodos normales incluyen cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía en columna de dimensionamiento y de afinidad), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica normal para purificación de proteínas. Se pueden unir marcas de afinidad tal como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de cubierta de influenza y glutatona-S-transferasa a la proteína para permitir fácil purificación por el paso de una

264

columna apropiada de afinidad. También se pueden caracterizar físicamente las proteínas aisladas usando técnicas tal como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

- 5 Por ejemplo, primero se pueden concentrar sobrenadantes de los sistemas que segregan proteína recombinante en medio de cultivo usando un filtro comercialmente disponible de concentración de proteína, por ejemplo, una unidad de filtración Amicon o Millipore Pellicon.
- 10 Después del paso de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz adecuada de purificación. De manera alternativa, se puede enfriar una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser
- 15 acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede emplear un paso de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo
- 20 o carboximetilo. Finalmente, se pueden emplear uno o más pasos de cromatografía líquida de alto desempeño de fase invertida (RP-HPLC) que emplean medio hidrófobo de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición de
- 25 proteína-Fc de células madre de cáncer. Algunos o todos los

265

pasos anteriores de purificación, en varias combinaciones, también se pueden emplear para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

Se puede aislar proteína recombinante producida en cultivo bacteriano, por ejemplo, por extracción inicial de sedimentos celulares, seguido por una o más concentraciones, saladura, pasos de cromatografía de exclusión de tamaño de intercambio iónico, acuoso. Se puede emplear cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) para pasos finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden romper por cualquier método conveniente, incluyendo ciclo de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonido, rompimiento mecánico, o el uso de agentes de lisis.

La presente invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer usando los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer descrito en la presente. En ciertas modalidades, el método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer *in vitro*. Por ejemplo, se cultiva una línea de células inmortalizadas o una línea de células de cáncer que expresan un marcador de células madre de cáncer en medio al

cual se adiciona un anticuerpo contra el marcador expresado de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento celular. En algunas modalidades, se aíslan células de tumor que comprenden células madre de tumor a partir de una muestra de
5 paciente tal como por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra sanguínea y se cultivan en un medio al cual se adiciona un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento celular.

En algunas modalidades, el método para inhibir el
10 crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer *in vivo*. En ciertas modalidades, la puesta en contacto de una célula tumorigénica con un anticuerpo contra
15 un marcador de células madre de cáncer se emprende en un modelo de animal. Por ejemplo, se cultivan xenoinjertos que expresan un marcador de células madre de cáncer en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que se administran con un anticuerpo contra un marcador de células
20 madre de cáncer para inhibir el crecimiento tumoral. En algunas modalidades las células madre de cáncer que expresan un marcador de células madre de cáncer se aíslan de una muestra de paciente tal como por ejemplo una biopsia de tejido, efusión pleural, muestra sanguínea y se inyectan en
25 ratones inmunocomprometidos que entonces se administran con un

anticuerpo contra el marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas modalidades, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se administra al mismo tiempo o brevemente después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para impedir el crecimiento tumoral. En algunas modalidades, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se administra como un producto terapéutico después de que se han cultivado las células tumorigénicas hasta un tamaño especificado.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos que seleccionan como objetivo un marcador de células madre de cáncer. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso al inhibir el crecimiento de células tumorales y al tratar cáncer en pacientes humanos.

Se preparan formulaciones para almacenamiento y uso al combinar un anticuerpo purificado de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, portador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). Los vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, amortiguadores no tóxicos tal como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tal como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina;

268

conservadores (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil-
amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio;
cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico;
alquil-parabenos, tal como metil- o propil-parabeno; catecol;
5 resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol);
polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, de menos de
10 residuos de aminoácido); proteínas tal como albúmina de
suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal
como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina,
10 glutamina, asparagina, histidina, arginina, o glicina;
carbohidratos tal como monosacáridos, disacáridos, glucosa,
mannosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares
tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones
formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por
15 ejemplo, complejos Zn-proteína); y agentes tensioactivos no
iónicos tal como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

La composición farmacéutica de la presente invención
se puede administrar de cualquier número de maneras para
tratamiento ya sea local o sistémico. La administración puede
20 ser tópica (tal como a las membranas mucosas incluyendo
distribución vaginal y rectal) tal como parches transdérmicos,
ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios,
aspersiones, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por
inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por
25 nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y

transdérmica; oral; o parenteral incluyendo infusión o inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

5 La formulación terapéutica puede estar en la forma de dosis unitaria. Estas formulaciones incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración
10 por inhalación. En composiciones sólidas tal como tabletas, el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los ingredientes convencionales de formación de tabletas incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio,
15 fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. La composición de pre-formulación sólida
20 entonces se sub-divide en formas de dosis unitarias del tipo descrito anteriormente. Las tabletas, píldoras, etc., de la nueva composición se pueden revestir o combinar de otro modo para proporcionar una forma de dosis que de la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede
25 comprender una composición inerte cubierta por un componente

exterior. Adicionalmente, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o que se retrase en la liberación. Se pueden usar una variedad de materiales tal como capas o revestimientos entéricos, que son materiales que incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con estos materiales tal como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

10 Las composiciones farmacéuticas incluyen anticuerpos de la presente invención vueltos complejos con liposomas (Epstein, et al., 1985, *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang et al., *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; y Patentes de los Estados Unidos número 4,485,045 y 4,544,545). Se describen liposomas con tiempo mejorado de circulación en la Patente de los Estados Unidos número 5,013,556. Se pueden generar algunos liposomas por evaporación de fase inversa con una composición de lípido que comprende una fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-
20 PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño definido de poro para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los anticuerpos también se pueden atrapar en microcápsulas. Estas microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial,

por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de distribución de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, (2000).

Además se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos formados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tal como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos número 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tal como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), acetato-isobutirato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

En algunas modalidades, el tratamiento comprende la administración combinada de un anticuerpo de la presente

292

invención en agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un anticuerpo puede presentarse antes de, concurrente con, o subsiguiente a la administración de quimioterapias. Las quimioterapias contempladas por la invención incluyen sustancias químicas o fármacos que se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles, tal como doxorubicina, 5-Fluorouracilo, Citosina-arabinósido ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Busulfano, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalan, Vinblastina y Carboplatina. La administración combinada puede incluir co-administración ya sea en una formulación farmacéutica individual o usando formulaciones separadas, o administración consecutiva en cualquier orden pero en general dentro de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos puedan exceder simultáneamente sus actividades biológicas. La preparación y programas de dosificación para estos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes o como se determine empíricamente por el practicante experto. La preparación y programas de dosificación para estas quimioterapias también se describe en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

En ciertas modalidades de la invención, el tratamiento comprende la administración combinada de un anticuerpo de la presente invención y un segundo agente

223

terapéutico. Como se usa en la presente, "un segundo agente terapéutico" incluye, pero no se limita a, agente quimioterapéutico, terapias de radiación, citocina y anticuerpo contra otro antígeno asociado a tumor.

5 En otras modalidades, el tratamiento comprende la administración combinada de un anticuerpo de la presente invención y terapia de radiación. El tratamiento con el anticuerpo puede ocurrir antes de, concurrente con, o subsiguiente a la administración de la terapia de radiación.
10 Se puede usar cualquier programa de dosificación para esta terapia de radiación como se determine por el practicante experto.

 En otras modalidades, el tratamiento puede comprender la administración combinada de anticuerpos de la
15 presente invención con otros anticuerpos contra antígenos adicionales asociados a tumor que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen al receptor de EGF (EGFR) (Erbitux^{MR}), el receptor de erbB2 (HER2) (Herceptin^{MR}), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Avastin^{MR}).
20 Adicionalmente, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas, y se puede lograr por remoción quirúrgica de células de cáncer o cualquier otra terapia juzgada necesaria por un facultativo que trata.

 Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis
25 apropiada de un anticuerpo de la presente invención depende

del tipo de enfermedad que se va a tratar, de la severidad y curso de la enfermedad, de la sensibilidad de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente, y demás todo a discreción del facultativo que trata. El anticuerpo se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una curación o se logre una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Se pueden calcular programas óptimos de dosificación a partir de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo individual. El facultativo que administra puede determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías de dosificación y proporciones de repetición. En general, la dosis es de 0.01 μ a 100 mg por kg de peso corporal, y se puede dar una vez o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente. El facultativo que trata puede estimar las proporciones de repetición para la dosificación en base a los tiempos medidos de residencia y a las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales.

La presente invención proporciona kits que comprenden los anticuerpos descritos en la presente y que se pueden usar para realizar los métodos descritos en la

presente. En ciertas modalidades, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra un marcador de células madre de cáncer en uno o más recipientes. En algunas modalidades, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o

5 suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de resultados. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos descritos de la presente invención se pueden

10 incorporar fácilmente en uno de los formatos establecidos de kit que son bien conocidos en la técnica.

Las modalidades de la presente invención se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que describen en detalle la preparación de

15 anticuerpos de la presente descripción y métodos para usar los anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden practicar muchas modificaciones, tanto a los materiales como a los métodos, sin apartarse del alcance de la presente descripción. Dondequiera

20 que sea posible, los mismos números de referencia se usarán a todo lo largo de las figuras para referirse a las mismas o similares partes. Como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "o" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto

25 dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la

referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de estos anticuerpos o uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la técnica. Adicionalmente, todos los números que expresen cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, pureza, o polipéptido de longitudes de polinucleótido, y demás, usados en la especificación, se modifican por el término "aproximadamente" a menos que se indique de otro modo. Por consiguiente, los parámetros numéricos expuestos en la especificación y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de Anticuerpos de DLL4 Monoclonales y Humanizados

Producción de Antígenos

Se generó un fragmento de polipéptido recombinante del dominio extracelular de DLL4 humano como un antígeno para la producción de anticuerpos. Se usó tecnología normal de ADN recombinante para aislar a un polinucleótido que codifica para los aminoácidos 1-522 de DLL4 (SEQ ID NO: 25). Este polinucleótido se ligó en cuadro N-terminal a ya sea una Fc-marca humana o histidina-marca y se clonó en un vector de plásmido de transferencia para expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Se usaron protocolos de

2577

normales de transfección, infección y cultivo celular para producir células recombinantes de insecto que expresan el correspondiente polipéptido de DLL4 (O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)).

La escisión de la secuencia se señal endógena de DLL4 humano se aproximó usando software de predicción de escisión SignalP 3.0, sin embargo, el punto real de escisión *in vivo* puede diferir por un par de aminoácidos en cualquier dirección. La escisión prevista de DLL4 está entre los aminoácidos 1 y 26, de esta manera la proteína de antígeno de DLL4 comprende aproximadamente el aminoácido 27 hasta el aminoácido 522. Se purificó la proteína de antígeno de medio acondicionado con células de insecto usando cromatografía de afinidad de Ni^{++} -quelato y Proteína A. entonces se dializó la proteína purificada de antígeno contra PBS (pH=7), se concentró a aproximadamente 1 mg/ml, y se filtró estéril en la preparación para inmunización.

Inmunización

Se inmunizaron ratones (n=3) con proteína purificada de antígeno de DLL4 (Antibody Solutions, Mountain View, CA) usando técnicas normales. Se examinó la sangre de ratones individuales aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para reconocimiento de antígenos usando análisis de ELISA y FACS (descritos en detalle más adelante).

Los dos animales con los títulos más altos de anticuerpo se seleccionaron para refuerzo final con antígeno después de lo cual se aislaron células de bazo para la producción de hibridomas. Las células de hibridoma se colocaron en placas de 96 concavidades a 1 célula por concavidad, y el sobrenadante de cada concavidad se examinó por análisis de ELISA y FACS contra la proteína de antígeno. Se seleccionaron varios hibridomas con el título alto de anticuerpos y se aumentaron en escala en cultivo estático en matraz. Se purificaron los anticuerpos del sobrenadante de hibridoma usando cromatografía de proteína A o proteína G-agarosa. Nuevamente se probaron los anticuerpos monoclonales purificados por FACS y se isotipificaron para seleccionar los anticuerpos de IgG e IgM.

Análisis de FACS

Para seleccionar anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, se usaron clones que reconocen la proteína de DLL4 de superficie celular, nativa, por análisis FACS. Se co-transfectaron células HEK293 con vectores de expresión que codifican para el clon de ADNc de longitud completa de DLL4 y el marcador de transfección, GFP. Veinticuatro o cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se recolectaron en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpos anti-DLL4 o IgG de control para detectar la unión de anticuerpo de fondo. Las células se lavaron y los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos

279

secundarios anti-ratón conjugados a un cromóforo fluorescente. Entonces se clasificaron las células marcadas por FACS para identificar anticuerpos anti-DLL4 que reconoce de manera específica la expresión en superficie celular de la proteína de DLL4 de superficie celular, nativa. Los anticuerpos monoclonales 21M14 y 21M18 reconocieron DLL4 en células transfectadas (Figura 1). El anticuerpo murino 21M18 se depositó en American Tissue Culture Collection (No. X).

Entonces, se determinó, usando citometría de flujo la capacidad de los anticuerpos dirigidos hacia DLL4 para interferir con la interacción entre DLL4 y Notch. Se incubaron células HEK293 establemente transducidas con ADNc de DLL4 con ya sea Notch1-EGF10-15-Fc o proteína-Fc de control en la presencia de anticuerpos de control o anti-DLL4. Se detectó la unión de las proteínas de fusión de Fc a células que expresan DLL4 por anticuerpo anti-Fc de cabra conjugados a PE y citometría de flujo. Entonces se determinó, por una disminución en la intensidad de fluorescencia la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para inhibir la unión de Notch a DLL4. Como se muestra en la Figura 2A, se observó inhibición de la unión de Notch con los anticuerpos murinos 21M14 y 21M18, pero no 21M12. Adicionalmente, 21M18 murino se usa de manera específica a DLL4 humano pero no murino, y bloquea la unión de DLL4 humano pero no DLL4 murino que se une a células que expresan Notch 1 (Figura 2B). Estos datos indican que

21M18 en experimentos de xenoinjerto seleccionan como objetivo DLL4 humano expresado en las células tumorales y no el DLL4 murino expresado en la vasculatura.

Correlación de Epítomos

5 Para identificar los anticuerpos que reconocen regiones específicas del dominio extracelular de DLL4, se realizó la correlación de epítomos. Se generaron, usando tecnología normal de ADN recombinante, vectores de plásmidos de expresión de mamífero que comprenden un promotor de CMV en
10 la dirección 5' de los polipéptidos que codifican para una serie anidada de fragmentos de supresión del dominio extravascular de DLL4 fusionado a proteínas de Fc. También se generaron, usando tecnología normal de ADN recombinante construcciones adicionales que codificaron para fragmentos de
15 DLL4 que fueron quimeras de DLL4 humano y de ratón fusionado a la proteína de Fc. Se diseñó una serie adicional de proteínas de fusión de DLL4-Fc que incluyeron sustituciones específicas de aminoácidos. Estas proteínas de fusión recombinante se expresaron en células HEK 293 transitoriamente transfectadas
20 de las cuales se recolectó medio acondicionado veinticuatro a veintiocho horas después de la transfección por ELISA. Los fragmentos de proteína de fusión de DLL4 se capturaron en placas revestidas con anticuerpos anti-Fc humana. Entonces se dejaron que los anticuerpos anti-DLL4 interactúen con los
25 fragmentos de DLL4 unidos y se midió la unión por incubación

subsiguiente con anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP y
detección de la actividad de HRP (Figura 3A). Como se muestra
en la Figura 3A, los anticuerpos murinos monoclonales 21M14 y
21M18 reconocen el epítipo contenido dentro de los aminoácidos
5 1-217 de DLL4. Esta región contiene un motivo llamado el
dominio "DSL (Delta/Serrado/lag-2)" presente en varios
ligandos de Notch (Tax et al., 1994, *Nature* 368:150-4).
Adicionalmente, se examinaron varios anticuerpos monoclonales
anti-DLL4 para la unión a fragmentos de proteína de fusión de
10 DLL4 por análisis de transferencia western (Figura 3B). Este
trabajo demuestra la unión específica humana de 21M18 a DLL4
con los aminoácidos 1-154 en la presencia de un dominio DSL
presente dentro de los aminoácidos 155-217. Esto demuestra una
importancia anteriormente inapreciada de esta secuencia N-
15 terminal de la función de DLL4. Este trabajo se resume en
forma esquemática (Figura 3C) con las unión de 21M18 o
carencia de unión denotada por "+" o "-", respectivamente. La
unión de 21M18 se caracterizó adicionalmente por examen de la
unión de 21M18 a una serie de fragmentos de proteína de DLL4
20 (DLL4dom1-6) que contiene sustituciones específicas de
aminoácidos que cambian los aminoácidos de DLL4 humano por los
correspondientes aminoácidos murinos. Estas proteínas de
fusión se examinaron para la unión a 21M18 por ELISA. Se
identificaron varias posiciones como importantes para la unión
25 de 21M18 como se muestra (Figura 3D). 21M18 presenta unión

degradada a fragmentos de proteína de DLL4 con sustituciones en los aminoácidos 68, 69 y 71 (reemplazo de valina, valina y prolina) o en los aminoácidos 142 y 144 (reemplazo de lisina y alanina). En contraste, un anticuerpo distinto 21M21 se une a un epítipo contenido dentro de la región de DSL (Figura 3E), pero este anticuerpo no impacta la función de DLL4 como se muestra en la Figura 6, demostrando que la unión de DSL no predice un anticuerpo funcional.

Anticuerpos Quiméricos

Después de que se identifican anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente DLL4, estos anticuerpos se modifican para superar la respuesta inmunitaria de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) cuando se usan anticuerpos de roedor como agentes terapéuticos. En ciertas modalidades, las regiones variables de la cadena pesada de cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado por RT-PCR a partir de células de hibridoma y se ligan en cuadro a regiones constantes de cadena ligera kappa y cadena pesada de IgG₁ humana, respectivamente, en vectores de expresión de mamífero. De manera alternativa, se usa un vector de expresión de Ig humano tal como TCAE 5.3 que contiene los genes de región constante de cadena ligera kappa y cadena pesada de IgG₁ humana en el mismo plásmido (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Entonces se co-transfectan vectores de expresión que codifican para cadenas pesada y

ligera quiméricas en células de ovario de hámster Chino (CHO) para producción de anticuerpos quiméricos. La inmunorreactividad y la afinidad de los anticuerpos quiméricos se comparan a anticuerpos murinos parentales por ELISA y FACS.

5 Anticuerpos Humanizados

En ciertas modalidades, se generan anticuerpos humanizados contra DLL4. Los dominios variables del anticuerpo monoclonal murino 21M18 se aislaron y se secuenciaron a partir de la línea de hibridoma usando PCR degenerada esencialmente como se describe en Larrick J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1250 y Jones, S.T. & Bending, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9:88. Entonces se eligieron regiones de soporte, variables, de cadena pesada y ligera, humanas que igualmente son estructuralmente similares a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 21M18 parental como las regiones de soporte, humanas para humanización. Para identificar las regiones de soporte, humanas, candidatas, las secuencias de proteína previstas codificadas por los dominios variables murinos V_H y V_L de 21M18 se comparan con secuencias de anticuerpo, humanas codificadas por ADNc humano expresado usando búsquedas BLAST para secuencia humana depositadas en Genbank. Usando este método, se seleccionan secuencias de ADNc, humanas, expresadas (por ejemplo genbank AY393019, DC295533) para análisis adicional al diseñar un soporte de cadena pesada.

Las diferencias de aminoácidos entre cadenas pesadas, de soporte, humanizadas, candidatas y la cadena pesada del anticuerpo 21M18 monoclonal murino de origen se evalúan para importancia probable, y un juicio hecho con respecto a si cada diferencia en la posición contribuye al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. Este análisis se guía por el examen de estructuras cristalinas resueltas de otros fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, la estructura de fab 2E8 como se describe en Trakhanov et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28). Se modelan estructuras usando software de computadora que incluye Jmol, quick PDB, y Pymol. Se da consideración al impacto potencial de un aminoácido en una posición determinada en el empaque del soporte de la β -hoja, la interacción entre los dominios variables de cadena pesada y ligera, el grado de exposición a solvente de la cadena lateral de aminoácidos, y la probabilidad que un aminoácido impactara la colocación de las asas de CDR. De este análisis, se sintetizaron químicamente cinco cadenas de V_H candidatas fusionadas en cuadro a la región constantes de IgG2 humana. Las cadenas pesadas candidatas comprenden: i) de un soporte humano funcional que contiene sustituciones seleccionadas dentro de la región de soporte, sintética basada en el análisis de impacto probable en la función de unión de 21M18 y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 1, 2 y 5).

De manera similar, se identifican diferencias de aminoácidos entre una cadena ligera de IGK(V)4-1 de soporte, humana, seleccionada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino 21M18 de origen, y entonces se hace juicio, con respecto a si cada diferencia en la posición contribuye al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. De este análisis, se sintetizan químicamente cinco cadenas de V_L candidatas. La primera cadena ligera candidata comprende: i) soporte humano de IGK(V)4-1 completo y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 de origen (SEQ ID Nos. 9, 10 y 11). Las cuatro cadenas ligeras candidatas adicionales comprenden: i) la región de soporte humana de IGK(V)4-1 con un número creciente de residuos murinos de 21M18 retenidos en la región de soporte y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 de origen (SEQ ID Nos: 9, 10 y 11).

La funcionalidad de cada cadena pesada y ligera humanizada, variante, candidata se prueba por co-transformación en células mamíferas. Cada una de las cinco cadenas pesadas de 21M18, humanizadas, candidatas descritas anteriormente se co-transfectan con el ADNc de cadena ligera de 21M18 murino en células HEK, y se valora el medio acondicionado para la actividad de unión al antígeno DLL4 por ELISA. La variante de la cadena pesada de 21M18 que exhibe la unión más fuerte se selecciona. Esta variante "21M18 H2" contiene, además de las CDR murinas, sustituciones en 6

posiciones de soporte dentro del soporte de Vh, posiciones de Kabat, 16, 20, 27, 28, 38 y 48 (Figura 4A). La cadena pesada humanizada 21M18 H2 entonces se co-transfecta con cada una de la 5 cinco cadenas ligeras humanizadas candidatas en células HEK293, y entonces se valora el medio acondicionado para la unión a antígeno por ELISA. Una variante de cadena ligera individual se encuentra que exhibe mejor unión que los otros candidatos, "21M18 L2", que retiene residuos murinos en las posiciones de Kabat 22 y 36 (Figura 5).

10 Entonces, se altera el residuo aislado de cisteína en CDR2 H2 (SEQ ID NO: 2). De manera específica, se sintetizan dos variantes de cadena pesada de H2 con el residuo de cisteína en la posición de Kabat 52a modificado a un residuo de serina (variante H7; SEQ ID NO: 3) o valina (variante H9; 15 SEQ ID NO: 4). Estas cadenas pesadas se co-transfectan en células HEK293 con L2, y medio acondicionado nuevamente valorado. Ambas variantes (21M18 H7L2 y 21M18 H9L2) demuestran unión específica a antígeno por ELISA. De esta manera las CDR 2 de cadena pesada de 21M18 comprende SEQ ID Nos: 2, 3 ó 4 en 20 las cuales el residuo en la posición de Kabat 52a comprende un residuo de cisteína, serina o valina.

En ciertas modalidades, se generaron anticuerpos humanizados contra DLL4. Los dominios variables del anticuerpo monoclonal murino 21M18 se aislaron y se secuenciaron de la 25 línea de hibridoma usando PCR degenerada esencialmente como se

287

describe en Larrick J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 1250 y Jones, S.T. & Bending, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9:88. Las regiones de soporte, variables de cadena pesada y ligera, humanas más similares a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 21M18 parentales entonces se eligieron como las regiones de soporte, humanas para humanización. Para identificar las regiones de soporte, humanas, más similares, las secuencias de proteína previstas codificadas por los dominios variables murinos de V_H y V_L de 21M18 se compararon con dominios variables de Ig codificados por el genoma humano usando búsquedas de BLAST para secuencia genómica humana depositada en Genbank. Usando este método, se eligió IGH(V)1-18 como la región de soporte, de cadena pesada, humana y se eligió IGK(V)4-1 como la región de soporte, de cadena ligera, humana.

Las diferencias de aminoácidos entre la cadena pesada de IGH(V)1-18 de soporte, humana, seleccionada y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 21M18 parental se identificaron, y entonces se hizo un juicio con respecto a si cada diferencia en la posición contribuyó al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. Este análisis se guió por el examen de estructuras cristalinas resueltas de otros fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, la estructura de fab 2E8 como se describe en Trakhanov et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28). Las estructuras se

268

modelaron usando software de computadora que incluye Jmol, quick PDB, y Pymol. Se dio consideración al impacto potencial de un aminoácido en una posición determinada en el paquete del soporte de la β -hoja, la interacción entre los dominios variables de cadena pesada y ligera, el grado de exposición a solvente de la cadena lateral de aminoácidos, y la probabilidad que un aminoácido impactara la colocación de las asas de CDR. De este análisis, se sintetizaron químicamente cinco cadenas de V_H candidatas fusionadas en cuadro a la región constante de IgG2 humana. La primera cadena pesada candidata comprendió: i) un soporte humano de IGH(V)1-18 completo y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 1, 2 y 5). Las cuatro cadenas pesadas candidatas adicionales comprendieron: i) la región de soporte, humana de IGH(V)1-18 con un número creciente de residuos murinos de 21M18 retenidos en la región de soporte y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 1, 2 y 5).

De manera similar, se identificaron diferencias de aminoácidos entre la cadena ligera de IGK(V)4-1 de soporte, humana, seleccionada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino 21M18 de origen, y entonces se hizo un juicio con respecto a si cada diferencia en la posición contribuyó al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. De este análisis, se sintetizaron químicamente cinco cadenas de V_L candidatas. La primera cadena ligera candidata comprendió: i)

un soporte humano de IGK(V)4-1 completo y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos. 9, 10 y 11). Las cuatro cadenas ligeras candidatas adicionales comprendieron: i) la región de soporte, humana de IGK(V)4-1 con un número
5 creciente de residuos murinos de 21M18 retenidos en la región de soporte y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 9, 10 y 11).

Mediante co-transfección en células mamíferas se robó la funcionalidad de cada cadena pesada y ligera,
10 humanizada, variante, candidata. Cada una de las cinco cadenas pesadas de 21M18, humanizadas, candidatas descritas anteriormente se co-transfectó con el ADNc de cadena ligera de 21M18 murino en células HEK293, y entonces se valoró el medio acondicionado para la actividad de unión al antígeno de DLL4
15 por ELISA. Se seleccionó la variante de cadena pesada de 21M18 que exhibe la unión más fuerte. Esta variante, "21M18 H2" contuvo, además de las CDR murinas, residuos murinos en cinco posiciones de soporte, las posiciones de Kabat 20, 28, 38, 48 y 69 (Figura 4). La cadena pesada humanizada 21M18 H2 entonces
20 se co-transfectó con cada una de las cinco cadenas ligeras humanizadas candidatas en células HEK293, y nuevamente se valoró el medio acondicionado para la unión al antígeno por ELISA. Se encontró que variante de cadena ligera individual exhibe mejor unión que los otros candidatos, "21M18 L2", que
25 retiene los residuos murinos en las posiciones de Kabat 22, 36

(Figura 5).

Entonces, se alteró el residuo asilado de cisteína en CDR2 H2 (SEQ ID NO: 2). De manera específica, se sintetizaron dos variantes de cadena pesada de H2 con el residuo de cisteína en la posición de Kabat 52a modificado a un residuo de serina (variante H7; SEQ ID NO: 3) o de valina (variante H9; SEQ ID NO: 4). Estas cadenas pesadas se co-transfectaron en células HEK293 con L2, y nuevamente se valoró el medio acondicionado. Ambas variantes (21M18 H7L2 y 21M18 H9L2) demostraron unión específica a antígeno por ELISA. De esta manera las CDR 2 de cadena pesada de 21M18 comprende SEQ ID Nos: 2, 3 ó 4 en las cuales el residuo en la posición de Kabat 52a es un residuo de cisteína, serina o valina.

Los anticuerpos 21M18 humanizados entonces se caracterizaron adicionalmente. De manera específica, la afinidad de unión de los anticuerpos 21M18 humanizados purificados por cromatografía de proteína A se determinó usando Biacore. Se determinó la afinidad que es aproximadamente 0.33 nM para la variante H2L2 de 21M18.

Los anticuerpos 21M18 humanizado se depositaron con ATCC (21M18 H9L2, ATCC depósito no. PTA-8427 y 21M18 H7L2, ATCC depósito no. PTA-8425, depositados el 10 de mayo de 2007).

Anticuerpo Humanos

En algunas modalidades, usando tecnología de

gall

visualización en fagos se aislaron anticuerpos humanos que reconocen de manera específica el dominio extracelular de DLL4. Una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos se examina para reconocimiento específico y de alta afinidad del antígeno de DLL4 descrito anteriormente. De manera específica, se intercambian casetes de CDR en la biblioteca mediante sitios únicos de restricción de flanco por optimización de anticuerpos. Entonces se clonan regiones variables humanas optimizadas en un vector de expresión de Ig que contiene la cadena pesada y cadenas ligera kappa de IgG₁ humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO mamíferas.

Ejemplo 2: Ensayos *In Vitro* para Evaluar Anticuerpos Contra DLL4

Este ejemplo demuestra ensayos *in vitro* representativos para probar la actividad de anticuerpos generados contra DLL4 en proliferación celular, activación de Notch y citotoxicidad.

Ensayo de Proliferación

La expresión de DLL4 por diferentes líneas de células de cáncer se cuantifica usando análisis Taqman. Líneas de células identificadas como que expresan DLL4 se colocan en placa a una densidad de 10^4 células por concavidad en microplacas de cultivo de tejido de 96 concavidades y se dejan propagar durante 24 horas. De manera subsiguiente, se

cultivan células durante 12 horas adicionales en DMEM fresco con FCS al 2 % punto en el cual se adicionan anticuerpos anti-DLL4 versus anticuerpos de control al medio de cultivo en la presencia de 10 $\mu\text{mol/L}$ de BrdU. Después de la marcación con BrdU, se remueve el medio de cultivo, y las células se fijan a temperatura ambiente durante 30 minutos en etanol y se hacen reaccionar durante 90 minutos con anticuerpo anti-BrdU monoclonal conjugado con peroxidasa (clon BMG 6H8, fragmentos Fab). El sustrato se desarrolla en una solución que contiene tetrametilbencidina y se detiene después de 15 minutos con 25 μl de 1 mol/L de H_2O_4 . El color de la reacción se mide con un lector automático de placas de ELISA usando un filtro de 450 nm (UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Todos los experimentos se realizaron en triplicado. Se determina la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para inhibir la proliferación celular en comparación a anticuerpos de control.

Ensayo de Activación de Ruta

En ciertas modalidades, se determina *in vitro* la capacidad de los anticuerpos contra DLL4 para bloquear la activación de la ruta de señalización de Notch. Se co-transfectaron células HeLa cultivadas en DMEM complementado con antibióticos y FCS al 10 % con 1) vector indicador Hes1-Luc que contiene el promotor Hes1 en la dirección 5' de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir niveles de

señalización de Notch (Jarriault et al., 1995, *Nature* 377:355-8) en respuesta al ligando de DLL4 y 2) indicador de luciferasa de Renilla (Promega, Madison, WI) como un control interno para eficiencia de transfección. Entonces se

5 adicionaron células transfectadas a placas de cultivo revestidas durante la noche con 10 μ g/ml de proteína de DLL4-Fc. Entonces se adicionaron anticuerpos a DLL4 al medio de cultivo celular. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se midieron los niveles de luciferasa usando un

10 kit de ensayo dual de luciferasa (Promega, Madison, WI) con la actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada a la actividad de luciferasa de Renilla. De esta manera se determinó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la activación de la ruta de Notch inducida por DLL4. Se observó

15 inhibición de la activación de DLL4 de la activación de la ruta de Notch con los anticuerpos 21M14 y 21M18 murinos anti-DLL4 (Figura 6). En contraste, el anticuerpo 21M21 anti-DLL4 no inhibe la unión de Notch (Figura 6) a pesar de la unión al dominio DSL de DLL4 (Figuras 3A-3C).

20 En ciertas modalidades, se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para modular la activación génica en la dirección 3'. Se aislaron células de tumor de colon C8 de animales tratados con anticuerpos 21M18 murinos (descritos en detalle más adelante) y se determinó por RT-PCR la expresión

25 de los genes HES1 y ATOH-1 de la ruta de Notch. Se aisló el

204

ARN total del tejido tumoral con el kit de Tejido Fibroso RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad de muestras de ARN por la relación de 260 nm/280 nm. Se determinó la integridad de ARN al correr una alícuota de la muestra de ARN en un gel de agarosa desnaturalizante teñido con bromuro de etidio (EtBr). La relación de ARNr de 28s a 18s se visualizó usando una cámara FluorChem distribuida con el software AphaEasaFC. Se eluyeron muestras de ARN en agua libre de RNasa y se almacenaron a -80°C. La RT-PCR de tiempo real se hizo con una sondas no extensible fluorescente-dual que contiene el tinte indicador 3'-TAMRA FAM (6-carboxifluoresceína) y un 3'-TAMRA (6-tetrametilrodamina). Se usaron 100 microgramos del ARN total para PCR de tiempo real en un volumen final de 25 uL que contiene transcriptasa inversa, amortiguador Taqman 1X (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la mezcla de sonda/cebador. Se llevaron a cabo reacciones en un Sistema de PCR de Tiempo Real Rápido ABI 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA); 30 minutos a 48°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los resultados se analizaron usando el software SDS2.3 (Applied Biosystems). Se obtuvieron todos los conjuntos de cebadores y sondas de Applied Biosystems (Foster City, CA). Se normalizó el nivel de expresión de genes objetivo al nivel de expresión del gen Gus B de mantenimiento casero y se expresó como cantidad relativa.

245

El tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 redujo la expresión de HES1 e incrementó la expresión de ATOH-1 en comparación a tumores tratados de control (Figura 7A).

En algunas modalidades, se establecieron colonias de células tumorales OMP-C11 agotadas del linaje de ratón usando condiciones de cultivo conocidas para mantener células tumorigénicas *in vitro*. Estas colonias de células tumorales se colocaron con células 3T3 sin (3T3) incluyendo DLL4 humano (DLL4) sobreexpresado en la superficie celular en la presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de 21M18 murino o inhibidor de gamma-secretasa 5 μM (GSI, es decir DBZ). También se incluyó un control sin cubierta). En tanto que las células 3T3-DLL4 indujeron la expresión del gen HES1 y suprimieron la expresión del gen ATOH1 mostrado como relación de HES1:ATOH1), ya sea 21M18 o GSI solo se inhibieron cambios de gen objetivo de Notch inducidos por DLL4.

Ensayo de Citotoxicidad Dependiente de Complemento

En ciertas modalidades, se usan líneas de células de cáncer que expresan DLL4 o células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente hecha pasar como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (como se describe en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediada por un anticuerpo contra DLL4. Se suspendieron células en 200 μl de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con antibióticos y 5 % de FBS a 10^6 células/ml.

296

Entonces se mezclaron las células suspendidas con 200 μ l de suero o suero inactivado con calor con anticuerpos contra DLL4 o anticuerpos de control en triplicado. Las mezclas de células se incubaron durante 1 a 4 horas a 37°C en CO₂ al 5 %.

5 Entonces se recolectaron en células tratadas, se re-suspendieron en 100 μ l de anexina V marcada con FITC diluida en medio de cultivo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se adicionan cien microlitros de una solución de yoduro de propidio (25 μ g/ml) diluida en HBSS y se incuba
10 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se recolectan, se re-suspenden en medio de cultivo y se analizan por citometría de flujo. La citometría de flujo de geles teñidos con FITC proporciona cuentas celulares totales, y captación de yoduro de propidio por células muertas como un
15 porcentaje del número total de células, se usa para medir la muerte celular en la presencia de suero y anticuerpos contra DLL4 en comparación a suero inactivado con calor y anticuerpos de control. De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para mediar la citotoxicidad dependiente
20 de complemento.

Ensayo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo

En ciertas modalidades, se usan líneas de células de cáncer que expresan DLL4 o células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente hecha pasar como un
25 xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (como se describe

en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por un anticuerpo contra DLL4. Se suspenden células en 200 μ l de medio de cultivo RPMI 1640 libre de rojo de fenol complementado con antibióticos y 5 % de FBS a 10^6 células/ml. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica tratada con heparina por centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque para el uso como células efectoras. Entonces se mezclan las células objetivo (T) con células efectoras (E) PBMC a relaciones de E/T de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 concavidades en la presencia de al menos un anticuerpo de DLL4 o un anticuerpo de control. Los controles incluyen incubación de células objetivo solas y células efectoras solas en la presencia de anticuerpo. Se incuban mezclas de células durante 1 a 6 horas a 37°C en CO₂ al 5 %. Entonces se mide lactato-deshidrogenasa liberada (LDH), una enzima citosólica estable liberada en la lisis celular, por un ensayo colorimétrico (Ensayo de Citotoxicidad no Reactiva CytoTox96; Promega, Madison, WI). Se recolectan los datos de absorbancia a 490 nm con un lector de placa normal de 96 concavidades y se corrige el fondo. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula de acuerdo a la fórmula: % de citotoxicidad = $100 \times (\text{liberación experimental de LDH} - \text{liberación espontánea efectora de LDH} - \text{liberación espontánea objetivo de LDH}) / (\text{liberación máxima objetivo de LDH} -$

liberación espontánea objetivo de LDH). De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos contra DLL4 para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Ejemplo 3: Prevención *In Vitro* de Crecimiento Tumoral Usando

5 Anticuerpos anti-DLL4

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-DLL4 para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto. En ciertas modalidades, se preparan células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido
10 o efusión pleural) que se ha hecho pasar como un xenoinjerto en ratones para el re-paso en animales experimentales. Se remueve el tejido tumoral bajo condiciones estériles, se cortan piezas pequeñas, se pica completamente usando cuchillas estériles, y las suspensiones celulares individuales se
15 obtienen por digestión enzimática y rompimiento mecánico. De manera específica, se mezclan células de fusión pleural o las piezas de tumor resultante con colagenasa III ultrapura en medio de cultivo (200-250 unidades de colagenasa por mL) y se incuban a 37°C durante 1-4 horas con pipeteado hacia arriba y
20 hacia abajo a través de una pipeta de 10 mL cada 15-20 minutos. Las células digeridas se filtran a través de una malla de nilón de 40 μ M, se lavan con solución salina amortiguada de Hank (HBSS) que contiene 2 % de suero de becerro inactivado con calor (HICS) y HEPES 25mM (pH 7.4).
25 Entonces, las células tumorales disociadas se inyectan

Zed

subcutáneamente en las almohadillas grasas mamarias de ratones NOD/SCID para producir crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, primero se clasifican las células tumorales disociadas en células tumorigénicas y no tumorigénicas en base a los marcadores de superficie celular antes de la inyección en animales experimentales. De manera específica, las células tumorales disociadas como se describe anteriormente se lavan dos veces con solución salina amortiguada con Hepes (HBSS) que contiene 2 % de suero de becerro inactivado con calor (HICS) y se re-suspenden a 10^6 células por 100 μ l. se adicionan anticuerpos y las células se incuban durante 20 minutos en hielo seguido por dos lavados con HBSS/2 % de HICS. Los anticuerpos incluyen anti-ESA (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), anti-CD44, anti-CD24, y marcadores de Linaje anti-CD2, -CD3, -CD10, CD16, -CD18, -CD31, -CD64, y -CD140b (referidos colectivamente como Lin; BD Biosciences, San Jose, CA). Se conjugan directamente los anticuerpos a fluorocromos para seleccionar de manera positiva o negativa células que expresan estos marcadores. Se eliminan células de ratón al seleccionar contra células H2Kd+ y CD45+ murinas, y se eliminan las células muertas al usar el tinte de viabilidad DAPI. Se realiza la citometría de flujo en un FACSaria (BD Biosciences, San Jose, CA). Se usan los perfiles de dispersión lateral y dispersión delantera para eliminar las masas celulares. Entonces se inyectan subcutáneamente células

tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin, aisladas en ratones NOD/SCID para producir crecimiento tumoral.

En ciertas modalidades, se analizaron anticuerpos anti-DLL4 para su capacidad para reducir el crecimiento de células de tumor de colon UM-C4. Subcutáneamente se inyectaron células UM-C4 disociadas (10,000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones MOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de células tumorales, los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 (n=5) o PBS (n=10) dos veces por semana durante la duración del experimento. Se monitorizó el crecimiento de tumor semanalmente hasta que se detectó crecimiento, punto después del cual se midió el crecimiento del tumor dos veces por semana durante un total de 8 semanas. El tratamiento con anticuerpo 21M18 redujo el crecimiento de tumor por 54 % en comparación a controles inyectados con PBS (Figura 8).

Entonces se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para afectar la proliferación *in vivo*. Se aislaron tumores de colon C8 de animales tratados con anticuerpos 21M18 murinos o anticuerpos de control y se determinó la expresión de Ki67, un marcador de la proliferación celular, por inmunocitoquímica. De manera específica, se cortaron tumores incrustados en parafina, fijados con formalina en secciones de 4 um de grueso. Se

301

desparafinaron las secciones en xileno y se re-hidrataron en agua destilada. Se realizó la inmunohistoquímica de acuerdo a métodos normales. De forma breve, se sumergieron secciones en amortiguador de citrato (pH 6) en un baño de agua durante 20 minutos en la cámara Decoking para recuperar los antígenos. Los cortes se enfriaron durante aproximadamente 45 minutos y se enjuagaron en PBS. Se incubaron secciones con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente para remover peroxidasa endógena antes de la adición de anticuerpo primario. El Ki67 anti-humano de conejo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) a dilución 1:50 en amortiguador de dilución de caballo (1 % NHS, 1 % BSA, 0.1 % Tx-100, 0.05 % NaN₃ en PBS) se adicionó a cada sección y se incubó durante 1 hora o durante la noche a 4°C. Los cortes se incubaron tres veces en amortiguador de lavado (Gelatina 10 %, Tx-100 10 %, en PBS) durante 5 minutos cada uno. El anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con solución de HRP (Immpress anti-Rabbit pre-diluted, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) se adicionó a los cortes y se incubó durante 30 minutos. Después del lavado extensivo con amortiguador de lavado, se adicionó Rojo Vector Nova (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Los cortes se enjuagaron con agua, se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con medio de montaje permanente (Vectamount, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). El tratamiento con los anticuerpos

21M18 murinos anti-DLL4 redujo el número de células que expresan Ki67 en comparación a tumores tratados de control (Figura 9).

Ejemplo 4: Prevención *In Vivo* y Tratamiento de Crecimiento Tumoral Usando Anticuerpos Anti-DLL4 en Terapia de Combinación Anticuerpos de DLL4 en Combinación con Fluorouracilo

En ciertas modalidades, se analizaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con quimioterapia para la capacidad para reducir el crecimiento de células de tumor de colon UM-C4 *in vivo*. Se inyectaron subcutáneamente células UM-C4 disociadas (10,000 por animal) en la región del flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 o PBS dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin tratamiento concurrente con el agente de quimioterapia anti-metabolito, fluorouracilo (5-FU), administrado una vez por semana. Se monitorizó el crecimiento tumoral semanalmente hasta que se detectó el crecimiento, punto después del cual se midió el crecimiento del tumor dos veces por semana durante un total de 8 semanas. El tratamiento con anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 en combinación con 5-FU redujo el crecimiento tumoral a un mayor grado que ya sea el tratamiento solo (Figuras 10A-10B).

303

Anticuerpos de DLL-4 en Combinación con Anticuerpos de EGFR o VEGF

En ciertas modalidades, se probaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con anticuerpos anti-receptor de EGF (EGFR) para la capacidad para afectar la frecuencia de captación de tumor *in vivo*. Se inyectaron subcutáneamente células UM-C4 disociadas (10,000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, los animales (n=10) se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4, anticuerpos anti-EGFR, una combinación de anticuerpos anti-DLL4 y anti-EGFR, o PBS. Se detectaron tumores en todos los animales tratados con anticuerpos anti-DLL4 o anti-EGFR y 9 de 10 animales de control. En contraste, solo 2 de 10 animales tratados con una combinación de anticuerpos anti-DLL4 y anti-EGFR tuvieron tumores detectables varias semanas después del tratamiento (Figura 11). Adicionalmente, el tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 en combinación con anticuerpos anti-EGFR redujo la frecuencia de tumorigénesis versus ya sea tratamiento solo (Figura 11).

En ciertas modalidades, se aprobaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con anticuerpos anti-receptor de EGF (EGFR) para la capacidad para afectar la frecuencia de captación de tumor *in vivo*. Se implantaron células de tumor

C17 en ratones (n=10 por grupo) y se inició el tratamiento dos días después con ya sea anticuerpo de control, 21M18 murino, anticuerpos anti-VEGF, o la combinación de ambos anticuerpos. Cada anticuerpo se dosificó a 10 mg/kg, dado dos veces por semana. Tanto 21M18 como anti-VEGF redujeron el crecimiento tumoral, y la combinación fue más efectiva que cualquier anticuerpo solo (Figura 18).

Anticuerpos de DLL-4 en Combinación con Irinotecan

En ciertas modalidades, se probaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con el quimioterapéutico Irinotecan. En algunas modalidades, se inyectaron células disociadas de tumor OMP-C8 (10,000 por animal) subcutáneamente en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, se inyectaron animales intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 o anticuerpo de control dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin tratamiento concurrente con el agente quimioterapéutico Irinotecan administrado una vez por semana a una dosis de 7.5 mg/kg. Se monitorizó semanalmente el crecimiento de tumor hasta que se detectó el crecimiento, punto después del cual se midió dos veces por semana el crecimiento del tumor. El tratamiento con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 en combinación con Irinotecan redujo el crecimiento tumoral a un mayor grado que cualquier tratamiento solo (Figura 12A). Y, en tanto que el

205

crecimiento del tumor continuó o se aceleró en la mayoría de los animales después del cese del tratamiento semanal con 7.5 mg/kg de Irinotecan solo, la combinación de 10 mg/kg, dos veces por semana, de 21M18 anti-DLL4 y 7.5 mg/kg dos veces por semana de Irinotecan previno adicionalmente el crecimiento del tumor de colon después del cese del tratamiento en el día 56 durante más de cinco semanas (Figuras 13A-13B).

En ciertas modalidades, se probaron anticuerpos H7L2 21M18 humanizados anti-DLL4 en combinación con Irinotecan. En algunas modalidades, se inyectaron subcutáneamente células de tumor C8 disociadas (10,000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, se inyectaron animales intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 humanizados anti-DLL4, anticuerpos 21M18 murinos, o anticuerpos de control dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin el tratamiento concurrente con el agente de quimioterapia, Irinotecan, administrado una vez por semana a una dosis de 7.5 mg/kg. Se monitorizó semanalmente el crecimiento del tumor hasta que se detectó el crecimiento, punto después del cual se midió dos veces por semana el crecimiento del tumor. El tratamiento con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 humanizados en combinación con Irinotecan mostró eficiencia similar contra crecimiento de tumor como 21M18 murino (Figura 12B).

306

En algunas modalidades, se usó el tratamiento de combinación con 21M18 murino anti-DLL4 e Irinotecan para tratar tumores de colon establecidos. Se inyectaron subcutáneamente células C8 disociadas (10,000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Cuando las células inyectadas produjeron tumores de aproximadamente 60 mm³, se comenzó el tratamiento. Los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4, o un control dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin el tratamiento concurrente con el agente de quimioterapia, Irinotecan, administrado una vez por semana a una dosis de 7.5 mg/kg. El tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 en combinación con Irinotecan redujo el crecimiento de tumores establecidos de colon a un mayor grado que cualquier tratamiento solo (Figura 14).

En algunas modalidades, la terapia de combinación seguida por tratamiento con anticuerpo retraso la reincidencia del tumor. Se inyectaron subcutáneamente células C8 disociadas (10,000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Cuando las células inyectadas produjeron tumores de aproximadamente 150 mm³, se comenzó el tratamiento. Se administraron intraperitonealmente (i.p.), animales con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4, o de control dos veces por semana en combinación con

Irinotecan a 7.5 mg/kg una vez por semana durante un total de 32 días. Entonces se discontinuó el tratamiento de combinación y se trataron los anticuerpos con anticuerpos 21M18 de DLL4 o de control para el resto del experimento. El tratamiento con los anticuerpos 21M18 anti-DLL4 después de la terapia de combinación retrasó significativamente la reincidencia del crecimiento tumoral en comparación a los animales tratados con control (Figura 16). También se muestra el volumen inicial de tumor a los 47 días después de la terminación del tratamiento con Irinotecan (Figura 17).

Reducción con Anticuerpo de DLL4 de Frecuencia de Células Madre de Cáncer se Mejora por Irinotecan

En ciertas modalidades, usando un análisis de dilución limitante se determinó la capacidad de los anticuerpos 21M18 anti-DLL4 solos o en combinación con Irinotecan para reducir la frecuencia de células madre de cáncer. Después de 38 días de tratamiento, se aislaron tumores de colon C8 de ratones tratados con ya sea anticuerpos de control o 21M18 murinos de DLL4, Irinotecan, o anticuerpos 21M18 murinos de DLL4 en combinación con Irinotecan como se describe anteriormente. Como se describe más adelante se procesaron los tumores aislados (n=3 por grupo experimental). Los tumores se removieron, y se picaron con una cuchilla estéril. Para obtener suspensiones celulares individuales, se mezcló una solución de digestión que contiene

30

Colagenasa/Hialuronidasa:Dispasa (1:1:8 de 10X) en el medio
MEBM (Cambrex, East Rutherford, NJ) con una dilución 1:100 de
DNAsaI(Worthington, Lakewood, NJ) con la suspensión de tumores
se incubó a 1 hora a 37°C. Las células se centrifugaron y se
5 re-suspendieron en 1 ml de medio ACK (NH_4Cl 0.15M, KHCO_3 10
mm, Na_2EDTA 0.1 mM en agua destilada) en hielo durante 2
minutos para remover células sanguíneas rojas. Las células se
centrifugaron y se re-suspendieron a una concentración de 1×10^7
10 células/ml en amortiguador FACS y luego se incubaron con
anticuerpos de ratón biotinilados (dilución 1:200 de α CD45 de
ratón-biotina y dilución 1:100 de α -H₂Kd de ratón-biotina de
rata, BioLegend, San Diego, CA) en hielo durante 30 minutos
seguido por la adición de cuentas magnéticas de estreptavidina
(Invitrogen, Carlsbad, CA) para remover células de ratón. Las
15 células humanas restantes en la suspensión se recolectaron, se
contaron y diluyeron al la concentración deseada para uso
adicional. Entonces se re-inyectaron diluciones en serie de
células humanas en ratones inmunocomprometidos. De manera
específica, se inyectaron ratones con 900, 300, 100 ó 50
20 células tumorales humanas aisladas en la región del flanco
derecho (n=10 por grupo). Se valoró dos veces por semana el
volumen del tumor.

Al término del estudio en el día 81, se disminuyó el
porcentaje de ratones con tumores detectables en todos los
25 grupos inyectados con el anticuerpo 21M18 de DLL4 tratados con

células de tumor y aún disminuyó adicionalmente en células tumorales tratadas con 21M18 de DLL4-Irinotecan en comparación a aquellas tratadas con ya sea control o Irinotecan solo (Figura 15A). Usando estas frecuencias de generación de tumor, se calculó la frecuencia de células madre usando estadísticas Poisson proporcionado por el software L-Calcul^{MR} (descargable de <http://www.stemcell.com/search/default.asp>). De forma concisa, en base a las estadísticas de distribución de Poisson, exactamente una célula madre existe entre el número conocido de células inyectadas si 37 % de los animales fallan en desarrollar tumores. El tratamiento de tumores con Irinotecan solo incrementó el número de células madre de cáncer de 1:93 en tumores tratados con control a 1:82. En contraste, los anticuerpos anti-DLL4 redujeron la frecuencia de células madre de cáncer desde 1:93 en tumores tratados con control a 1:238 en tumores tratados con anticuerpo de DLL4 y a 1:573 en las células de tumor tratadas con la combinación de 21M18 de DLL4-Irinotecan (Figura 15B).

Ejemplo 5: Tratamiento *In Vivo* de Tumores Usando Anticuerpos anti-DLL4

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos 21M18 humanizados anti-DLL4 para tratar cáncer en un modelo de xenoinjerto. En ciertas modalidades, para el re-paso en animales experimentales se preparan células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido o efusión

310

pleural) que se ha hecho pasar como un xenoinjerto en ratones. Se remueve el tejido tumoral, se corta en piezas pequeñas, se pica completamente usando cuchillas estériles, y las suspensiones celulares individuales se obtiene por digestión 5 enzimática y rompimiento mecánico. Entonces se inyectan subcutáneamente células tumorales disociadas ya sea en las almohadillas grasas mamarias, para tumores de mama, o en el flanco, para tumores no de mama, de ratones NOD/SCID para producir crecimiento de tumor. De manera alternativa, se 10 aíslan células tumorigénicas de tumor ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin como se describe en detalle anteriormente y se inyectan.

Después de la inyección de células de tumor, los animales se monitorizan para el crecimiento de tumor. Una vez que los tumores alcanzan un tamaño promedio de aproximadamente 15 100 mm³, empieza el tratamiento con anticuerpo. Cada animal recibe 100 µg de anticuerpos humanizados 21M18 de DLL4 o anticuerpos de control i.p., dos a cinco veces por semana durante un total de 6 semanas. Se valora dos veces por semana el tamaño del tumor durante estas 6 semanas. De esta 20 manera se determina la capacidad de los anticuerpos humanizados de DLL4 para prevenir el crecimiento tumoral adicional o para reducir el tamaño de tumor en comparación a anticuerpos de control.

En el punto final del tratamiento con anticuerpo, se 25 recolectan los tumores para análisis adicional. En algunas

311

modalidades, se analiza una porción del tumor por inmunofluorescencia para valorar la penetración del anticuerpo en el tumor y la respuesta de tumor. Una porción de cada tumor recolectado de ratones tratados con anticuerpo de control o
5 tratados con anti-DLL4 se congelan frescos en nitrógeno líquido, se incrustan en O.C.T., y se corta en un criostato como secciones de 10 μ m en portaobjetos de vidrio. En algunas modalidades, una porción de cada tumor se fija en formalina, se incrusta en parafina y se corta en un micrótopo como
10 sección de 10 μ m en portaobjetos de vidrio. Las secciones de pos-fijan e incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen específicamente anticuerpos inyectados para detectar anticuerpos de control o anti-receptor de DLL4 presentes en la biopsia de tumor. Adicionalmente, los anticuerpos que detectan
15 diferentes tipos de células tumorales y reportadas por tumor tal como por ejemplo, anti-caderina VE (CD144) o anticuerpos anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células endoteliales vasculares, anticuerpos anti-alfa-actina de músculo liso para detectar células de músculo liso vascular, anticuerpos anti-
20 Ki67 para detectar células proliferantes, ensayos de TUNEL para detectar células tintorias, anticuerpos anti-fragmento de Notch de dominio intracelular (ICD) para detectar señalización de Notch, se pueden usar para valorar los efectos del tratamiento con anticuerpo, por ejemplo, en la angiogénesis,
25 crecimiento de tumor y morfología de tumor.

312

En ciertas modalidades, también se valora el efecto del tratamiento con anticuerpos humanizados anti-DLL4 en la expresión génica de células de tumor. Se extrae el ARN total de una porción de cada tumor recolectado de ratones tratados con anticuerpo de DLL4 y tratados con anticuerpo de control y se usan para RT-PCR cuantitativa. Se analizan los niveles de expresión de DLL4, receptores de Notch, componentes de la ruta de señalización de Notch, así como marcadores de células madre de cáncer anteriormente identificados (por ejemplo, CD44) con relación al gen de mantenimiento doméstico GAPDH con un control interno. De esta manera se determinan los cambios en la expresión génica de células tumorales en el tratamiento con anticuerpos de DLL4.

Además, se valor el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 en la presencia de células madre de cáncer en un tumor. Las muestras de tumor de ratones tratados con anticuerpo de DLL4 versus anticuerpo de control se cortan en pequeñas piezas, se pican completamente usando cuchillas estériles, y las suspensiones celulares estériles se obtienen por digestión esquemática y rompimiento mecánico. Entonces se analizan las células tumorales disociadas por análisis de FACS para la presencia de células madre de cáncer, tumorigénicas en base a la expresión del marcador de superficie celular ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin como se describe en detalle anteriormente.

313

La tumorigenicidad de células aisladas basadas en la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin después del tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 entonces se valora. En las almohadillas grasas mamarias de ratones NOD/SCID se re-
5 inyectan subcutáneamente células madre de cáncer ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin aisladas de ratones tratados con anticuerpo de DLL4 versus anticuerpo de control. Entonces se determina la tumorigenicidad de células madre de cáncer en base al número de células inyectadas requeridas para formación consistente de
10 tumor.

Ejemplo 6: Tratamiento de Cáncer Humano Usando Anticuerpos Humanizados Anti-DLL4

Este ejemplo describe métodos para tratar cáncer usando anticuerpos humanizados contra DLL4 a células objetivo
15 que comprenden células madre de cáncer y/o células tumorales en las cuales se ha detectado la expresión del receptor de Notch o el ligando de receptor de Notch. La presencia de la expresión del marcador de células madre de cáncer se puede determinar primero de una biopsia de tumor. Las células
20 tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer se remueven bajo condiciones estériles. En algunas modalidades, la biopsia de tejido se congela fresca en nitrógeno líquido, se incrusta en O.C.T., y se corta en un criostato como secciones de 10 μm en portaobjetos de vidrio.
25 En algunas modalidades, la biopsia de tejido se fija en

3/4

formalina, se incrusta en parafina, y se corta en un micrótomó como sección de 10 μ m en portaobjetos de vidrio. Se incuban secciones con anticuerpos contra DLL4 para detectar expresión de proteína.

5 También se puede determinar la presencia de células madre de cáncer. Las muestras de biopsia de tejido se cortan en piezas pequeñas, se pican completamente usando cuchillas estériles, y las células se someten a digestión enzimática e interrupción mecánica para obtener una suspensión celular
10 individual. Entonces se incuban células tumorales disociadas con anticuerpos anti-ESA+, CD44+, CD24, Lin, y -DLL4 para detectar células madre de cáncer, y se determina la presencia de células madre de tumor ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, DLL4+ por citometría de flujo como se describe en detalle
15 anteriormente.

Con anticuerpos humanizados anti-DLL4 se tratan pacientes con cáncer, cuyos tumores se diagnostican como que expresan un receptor de Notch ligando de receptor de Notch. En ciertas modalidades, los anticuerpos humanizados anti-DLL4 se
20 generan como se describe anteriormente y se purifican y formulan con un vehículo farmacéutico adecuado para inyección. En algunas modalidades, los pacientes se tratan con anticuerpos de DLL4 al menos una vez al mes durante al menos 10 semanas. En algunas modalidades, se tratan pacientes con
25 los anticuerpos de DLL4 al menos una vez por semana durante al

9/5

menos aproximadamente 14 semanas. Cada administración del anticuerpo debe ser una dosis farmacéuticamente efectiva. En algunas modalidades, se administra entre aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml de un anticuerpo anti-DLL4. En 5 algunas modalidades, se administra entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml de un anticuerpo anti-DLL4. El anticuerpo se puede administrar antes de, concurrente con, o después de regímenes normales de radioterapia o regímenes normales de quimioterapia usando uno o más agentes 10 quimioterapéuticos, tal como oxaliplatina, fluorouracilo, leucovorina, o estreptozocina. Los pacientes que monitorizan para determinar si este tratamiento ha dado por resultado una respuesta anti-tumor, por ejemplo, en base a la regresión del tumor, a la reducción en las incidencias de nuevos tumores, a 15 la menor expresión de antígeno de tumor, a los números disminuidos de células madre de cáncer, o a otros medios para evaluar prognosis de enfermedad.

Para los expertos en la técnica serán evidentes otras modalidades de la invención a partir de la consideración de la 20 especificación y de la práctica de la invención descrita en la presente. Se propone que la especificación de los ejemplos se considere sólo como ejemplo, con un alcance y espíritu verdadero de la invención que se indica por las siguientes reivindicaciones. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente se 25 incorporan como referencia en su totalidad en la descripción.

3/6

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de DLL4 humano que comprende los aminoácidos dentro de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), el anticuerpo está caracterizado porque afecta el crecimiento de un tumor que comprende células madre de cáncer.

2. Anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano se forma por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO: 26).

3. Anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano comprende además aminoácidos dentro del DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO: 26).

4. Anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP) de la región N-terminal de DLL4 humano.

5. Anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano comprende los aminoácidos V68, V69 y P71 de la región N-terminal de DLL4 humano.

6. Anticuerpo aislado de conformidad con la

3/17

reivindicación 2, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano comprende los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ) de la región N-terminal de DLL4 humano.

7. Anticuerpo aislado de conformidad con la
5 reivindicación 6, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano comprende los aminoácidos K142 y A144 de la región N-terminal de DLL4 humano.

8. Anticuerpo aislado de conformidad con la
reivindicación 2, caracterizado porque el epítipo de DLL4
10 humano comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP) y 139-146 (LISKIAIQ) de la región N-terminal de DLL4 humano.

9. Anticuerpo aislado de conformidad con la
reivindicación 8, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano comprende los aminoácidos V68, V69, P71, K142 y K144 de
15 la región N-terminal de DLL4 humano.

10. Anticuerpo aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la afección es una reducción en el volumen de tumor.

11. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal.

12. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es un anticuerpo quimérico.

25 13. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las

3/10

reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es un anticuerpo humanizado.

14. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es un anticuerpo humano.

15. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque es un anticuerpo de IgG.

16. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la IgG es IgG2.

17. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque es un fragmento de anticuerpo.

18. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

19. Anticuerpo aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende:

i. una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de aminoácidos de CDR CDR1 (SEQ ID NO: 1); CDR2 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4); y CDR3 (SEQ ID NO: 5); y

ii. una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de aminoácidos de CDR CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10); y CDR3 (SEQ ID NO: 11).

34

20. Anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque se produce por el hibridoma depositado con ATCC el 28 de septiembre de 2007 y que tiene el depósito de ATCC NO_.

5 21. Anticuerpo, caracterizado porque compete para la unión específica al DLL4 humano con un anticuerpo producido por el hibridoma depositado con la ATCC el 28 de septiembre de 2007 y que tiene el depósito de ATCC No_.

10 22. Anticuerpo humanizado que se une específicamente a un epítipo de DLL4 humano que comprende los aminoácidos dentro de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), caracterizado porque comprende: i) una región variable de cadena pesada que comprende una región de determinación de antígeno no humana y una región de soporte, variable, de
15 cadena pesada, humana, y ii) una región variable de cadena ligera que comprende una región de determinación de antígeno no humana y una región de soporte, variable, de cadena ligera, humana.

20 23. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el epítipo de DLL4 humano se forma por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27) y el DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO: 26).

25 24. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el epítipo de DLL4

320

humano comprende además los aminoácidos dentro del DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO:26).

25. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque se sustituye al menos
5 un residuo en la región de soporte, variable, de cadena pesada, humana.

26. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la por lo menos una sustitución es una sustitución de un residuo que ocupa la
10 posición correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

27. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque se sustituyen cinco o seis residuos en la región de soporte, variable, de cadena
15 pesada, humana.

28. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la por lo menos una sustitución en la región de soporte, variable, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 16H, 20H,
20 27H, 28H, 38H, y 48H en base al sistema de numeración de Kabat.

29. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la por lo menos una sustitución en la región de soporte, variable, humana está en
25 una posición seleccionada del grupo que consiste de 20H, 28H,

321

38H, 48H, y 69H en base al sistema de numeración de Kabat.

30. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque las posiciones 16H, 20H, 27H, 28H, 38H, y 48H están sustituidas en base al sistema
5 de numeración de Kabat.

31. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque las posiciones 20H, 28H, 38H, 48H, y 69H están sustituidas en base al sistema de numeración de Kabat.

10 32. Anticuerpo humanizado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, caracterizado porque la región de determinación de antígeno no humana de cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos de CDR CDR1 (SEQ ID NO: 1); CDR2 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO:
15 4); y CDR3 (SEQ ID NO: 5).

33. Anticuerpo humanizado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, caracterizado porque se sustituye al menos un residuo en la región de soporte, variable, de cadena ligera, humana.

20 34. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la por lo menos una sustitución es una sustitución de un residuo que ocupa la posición correspondiente de un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno no humana.

25 35. Anticuerpo humanizado de conformidad con la

reivindicación 33, caracterizado porque se sustituyen dos residuos en la región de soporte, variable, de cadena ligera, humana.

36. Anticuerpo humanizado de conformidad con la
5 reivindicación 33, caracterizado porque al menos un residuo en la región de soporte, variable, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 22L y 36L en base al sistema de numeración de Kabat.

37. Anticuerpo humanizado de conformidad con la
10 reivindicación 35, caracterizado porque las posiciones 22L y 36L se sustituyen en base al sistema de numeración de Kabat.

38. Anticuerpo humanizado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37, caracterizado porque la región de determinación de antígeno, no humana, de
15 cadena ligera comprende CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10); y CDR3 (SEQ ID NO: 11).

39. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque la región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID
20 NO: 8.

40. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque la región variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO: 12.

41. Anticuerpo humanizado de conformidad con la
25 reivindicación 22, caracterizado porque la región variable de

cadena pesada comprende SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8 y la región variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO: 12.

42. Anticuerpo aislado que se une de manera
5 específica a un epítipo de DLL4 humano que comprende los aminoácidos dentro de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO: 27), caracterizado porque inhibe la unión de DLL4 a receptor de Notch.

43. Anticuerpo, caracterizado porque compite para la
10 unión específica a DLL4 humano con un anticuerpo codificado por el plásmido depositado con la ATCC (depósito de ATCC no. PTA-8427 o PTA-8425).

44. Anticuerpo humanizado, caracterizado porque se
15 codifica por el plásmido depositado con ATCC no. PTA-8427 o PTA-8425.

45. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende:

- i. un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y
- 20 ii. un portador farmacéuticamente aceptable.

46. Vector aislado de polinucleótido, caracterizado porque codifica para un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44.

47. Célula hospedadora, caracterizada porque
25 comprende uno o más vectores de polinucleótido que codifican

gpl

para un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44.

48. Anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, caracterizado porque se emplea en el
5 tratamiento de cáncer.

49. Uso de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44 en la elaboración de un medicamento para tratar cáncer.

50. Uso de conformidad con la reivindicación 49, en
10 donde el uso comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo en combinación con un segundo agente terapéutico.

51. Uso de conformidad con la reivindicación 50, en donde el anticuerpo y el segundo agente terapéutico se dan de
15 manera concurrente o secuencial.

52. Uso de conformidad con la reivindicación 50, en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

53. Uso de conformidad con la reivindicación 52, en
20 donde el agente quimioterapéutico es Fluorouracilo o Irinotecan.

54. Uso de conformidad con la reivindicación 50, en donde el segundo agente terapéutico es un segundo anticuerpo terapéutico.

25 55. Uso de conformidad con la reivindicación 54, en

325

donde el segundo anticuerpo terapéutico es un anticuerpo anti-receptor de EGF o un anticuerpo anti-VEGF.

56. Uso de conformidad con la reivindicación 50, en donde el segundo agente terapéutico es terapia de radiación.

5 57. Método para diagnosticar cáncer, caracterizado porque comprende poner en contacto una muestra de paciente con un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, y diagnosticar cáncer en base a la localización de expresión de DLL4 en la muestra de paciente.

10 58. Método para elaborar anticuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, caracterizado porque comprende:

i. transformar células hospedadoras con un vector o vectores de expresión de polinucleótido que codifican para el anticuerpo;

ii. cultivar las células hospedadoras bajo condiciones que permiten la expresión del anticuerpo; y

iii. purificar el anticuerpo del medio de cultivo.

59. Línea de células transformadas, caracterizada porque expresa anticuerpos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44.

60. Hibridoma, caracterizado porque segrega el anticuerpo 21M18 depositado con la ATCC el 28 de septiembre de 2007 y que tiene el depósito de ATCC No._.

25 61. Plásmido, caracterizado porque codifica para

26

21M18 H9L2 (ATCC depósito no. PTA-8287) o 21M18 H7L2 (depósito ATCC no. PTA-8425).

62. Método para producir el anticuerpo 21M18 H9L2 o el anticuerpo 21M18 H7L2, caracterizado porque es por el
5 cultivo de células transfectadas con los plásmidos depositados con ATCC no. PTA-8427 o PTA-8425.

63. Kit que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, caracterizado porque la composición comprende un anticuerpo de conformidad con
10 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, y comprende además una inserción de paquete que indica que la composición se puede usar para tratar cáncer.

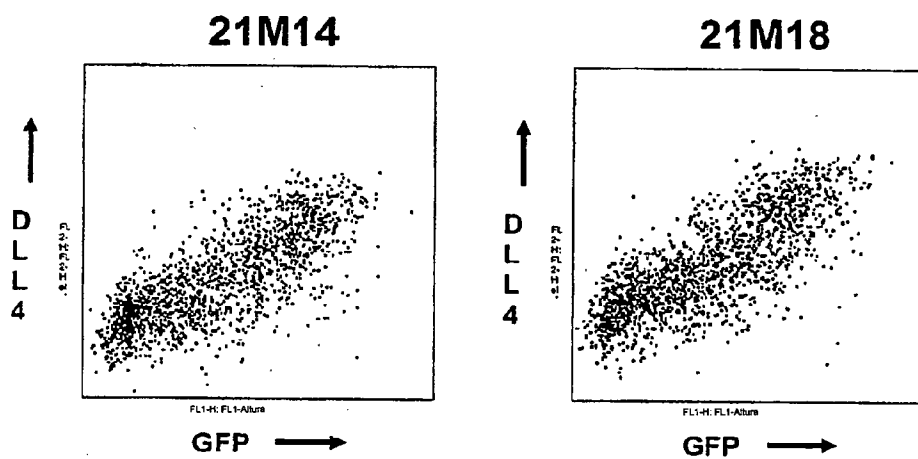
327

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe un anticuerpo aislado que se une de manera específica a un dominio extracelular de DLL4 humano y
5 afecta el crecimiento de un tumor que comprende células madre de cáncer. También se describe un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-DLL4.

398

Figura 1



329

Figura 2A

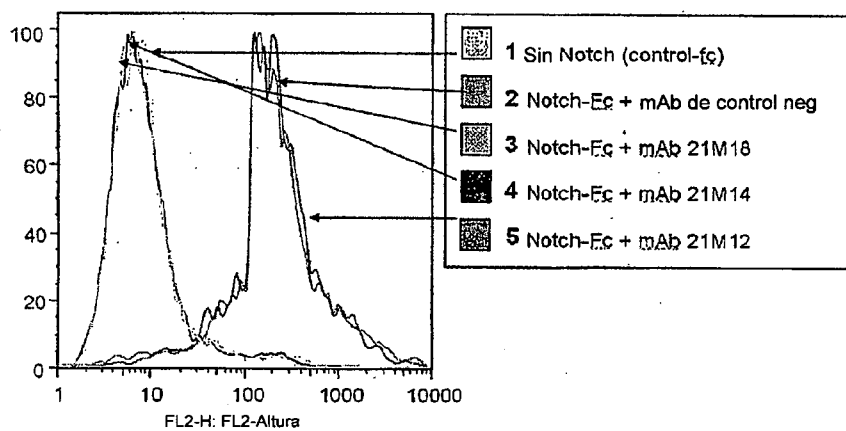
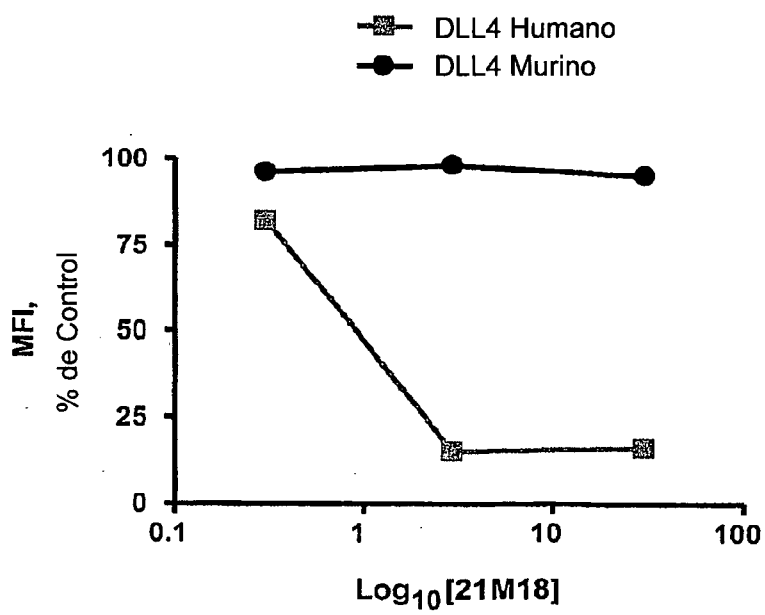
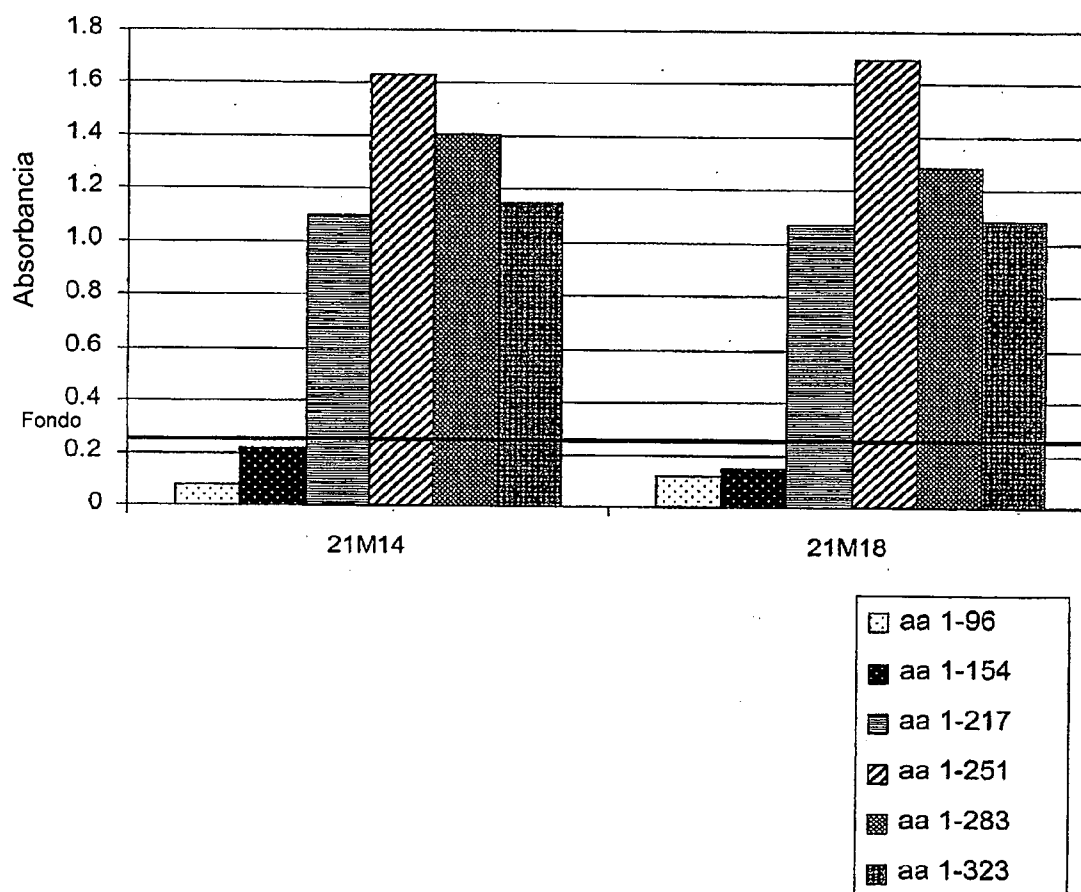


Figura 2B



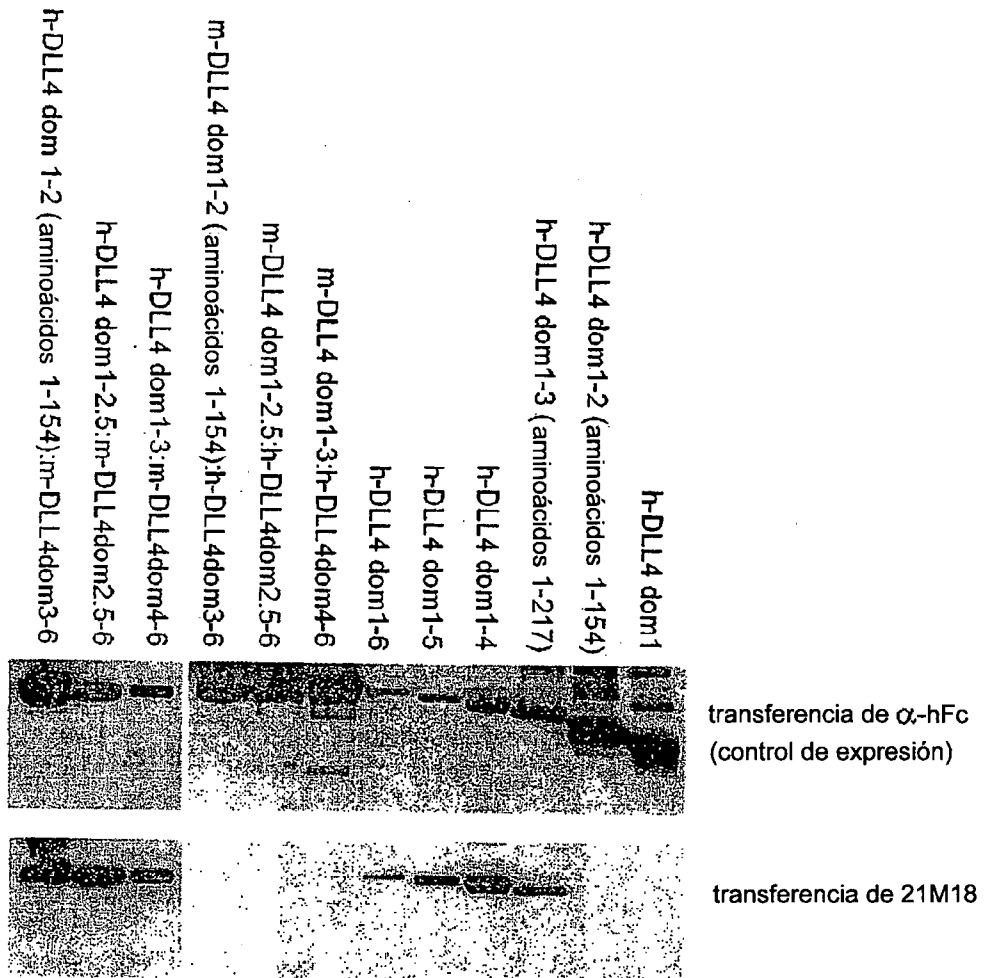
330

Figura 3A



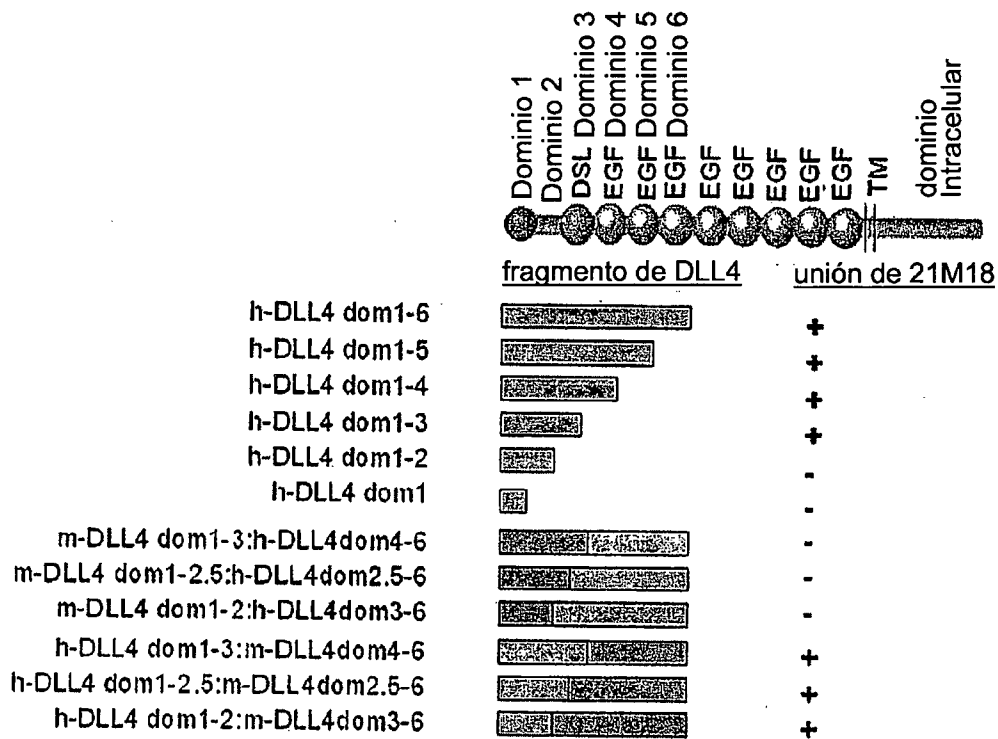
231

Figura 3B



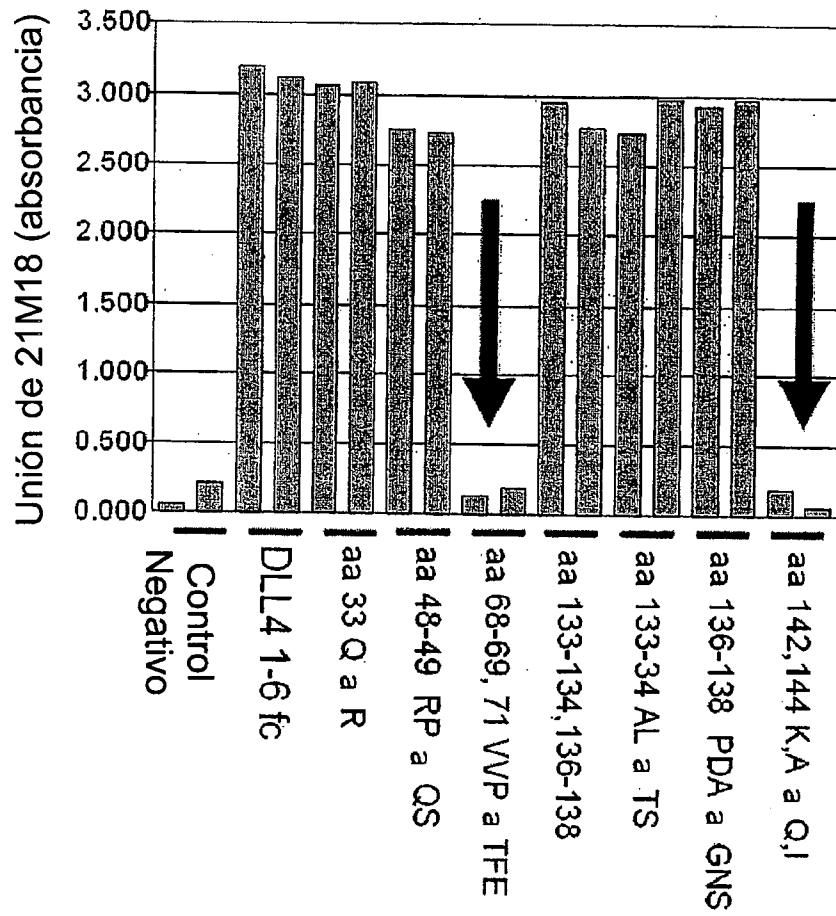
932

Figura 3C



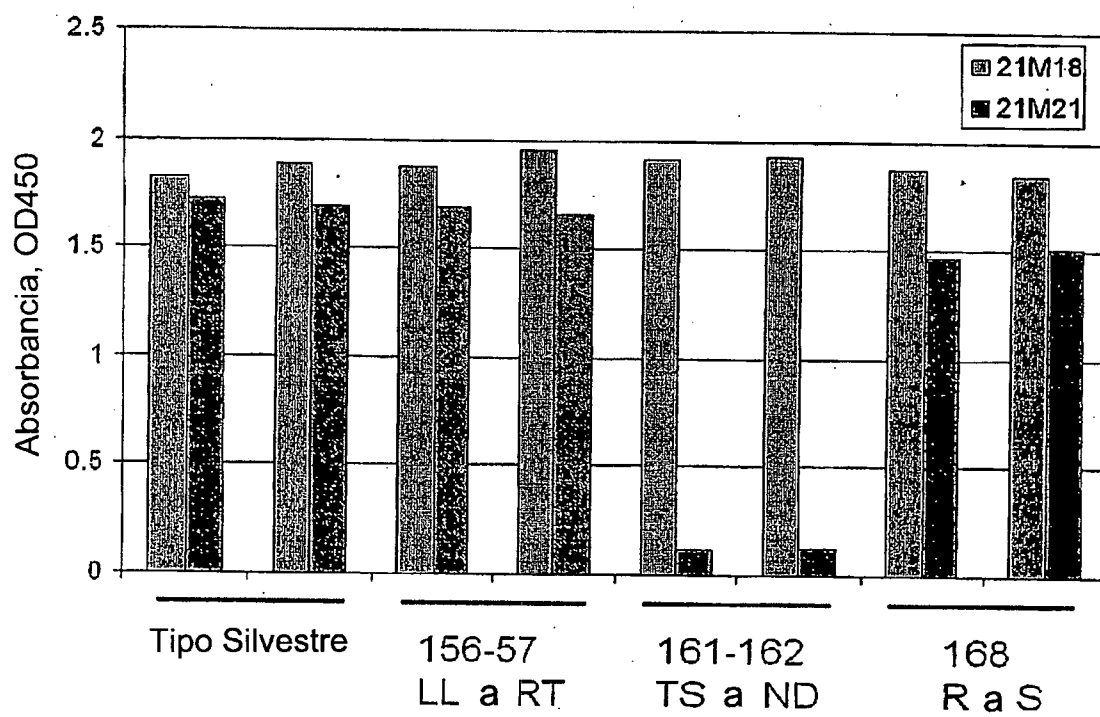
253

Figura 3D



331

Figura 3E



235

Figura 4A

	Secuencia de señal	1	2	3,4	CDR-1	5
m-21M18-Vh	1	NCWSEWIFLELHSGTAGVHS	EVOLQ	QSGP	EVKTCASVKISCRASGYSFTAYYIHNVKQSH	
EST-Soprote	1	MDWTWSILELVAARATGAHSQVQLVQSGAEVKKFGCSVRISCRASGCTPCTNVAWSVVRQAP				
H7	1	MDWTWSILELVAARATGAHSQVQLVQSGAEVKKFGASVKISCRASGYSFTAYYIHNVKQAP				
	6	CDR-2				
m-21M18-Vh	61	GKSLIEWIGYIS	CYNGATN	NQKFK	KATFTVDTSSSTAE	MQFNSLTSEDEAVYYCARDYD
EST-Soprote	61	QQGLEWMCRIILFHLERPNVAQKFCGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKXXK				
H7	61	QQGLEWIGYIS	CYNGATN	NQKFK	GRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD	
		CDR-3				
m-21M18-Vh	121	YDVGM	DYNGQCT	SVTVSS		
EST-Soprote	121	XXXXXXXXX	NGQCTL	VTSS		
H7	121	YDVGM	DYNGQCTL	VTSS		

Figura 4B

	Secuencia de señal	1	2	CDR-1	3
m-21M18-Vh	1	NCWSEWIFLELHSGTAGVHS	EVOLQ	QSGP	EVKTCASVKISCRASGYSFTAYYIHNVKQSH
h-Línea germinal-Vh	1	MDWTWSILELVAARATGAHSQVQLVQSGAEVKKFGASVKISCRASGYTFTSYGISNVVRQAP			
21M18-H2	1	MDWTWSILELVAARATGAHSQVQLVQSGAEVKKFGASVKISCRASGYSFTAYYIHNVKQAP			
	4	CDR-2			
m-21M18-Vh	61	GKSLIEWIGYIS	CYNGATN	NQKFK	KATFTVDTSSSTAE
h-Línea germinal-Vh	61	QQGLEWMCRIIS	CYNGATN	NQKFK	GRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKXXK
21M18-H2	61	QQGLEWIGYIS	CYNGATN	NQKFK	GRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
		CDR-3			
m-21M18-Vh	121	YDVGM	DYNGQCT	SVTVSS	
h-Línea germinal-Vh	121	XXXXXXXXX	NGQCTL	VTSS	
21M18-H2	121	YDVGM	DYNGQCTL	VTSS	

326

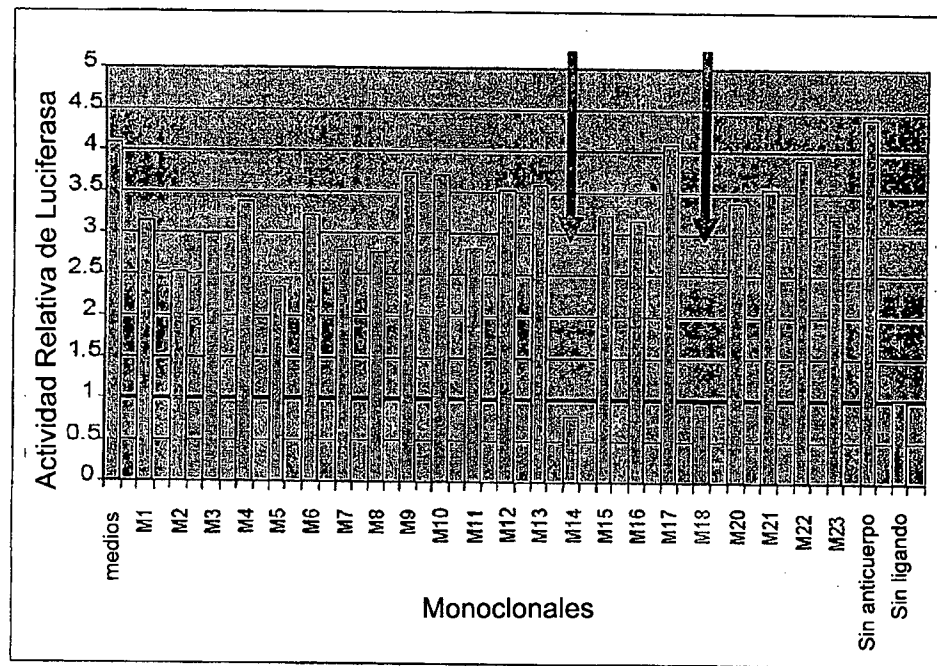
Figura 5

Alineación de secuencias de la región variable de cadena ligera

		Secuencia de señal	1	CDR-1
m - 21M18 - Vk	1	MEEDTLHLWVLLLVLPESKGDIVETQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDN--YGISFMR		
h - Línea germinal - Vk	1	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQEVLYSSNNKNTVA		
21M18 - L2	1	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDN--YGISFMR		
		2	CDR-2	CDR-3
m - 21M18 - Vk	59	WFQQKPGQPPKLLIYAASNOGSGVEARFSGSGSGTDFTLNTIHPMEEDTAMVCCQOSKEV		
h - Línea germinal - Vk	61	WFQQKPGQPPKLLIYASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLOAEDVAVVYCCQYYET		
21M18 - L2	59	WFQQKPGQPPKLLIYAASNOGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLOAEDVAVVYCCQOSKEV		
		CDR-3		
m - 21M18 - Vk	119	P-WTEGGGTKVEIK		
h - Línea germinal - Vk	121	PPWTFGQSTKVEIK		
21M18 - L2	119	P-WTEGGGTKVEIK		

397

Figura 6



578

Figura 7A

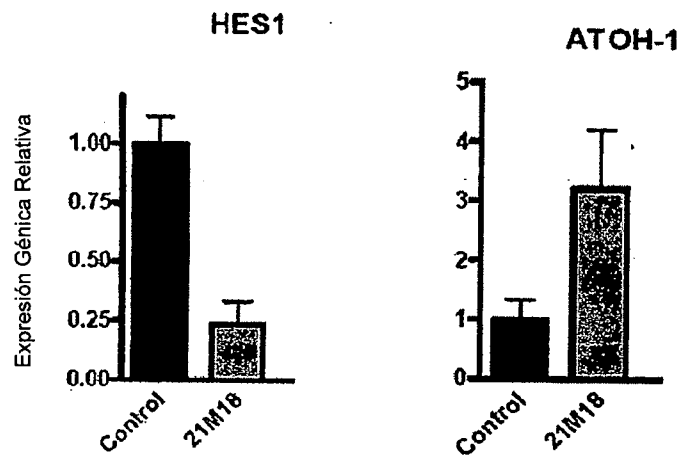
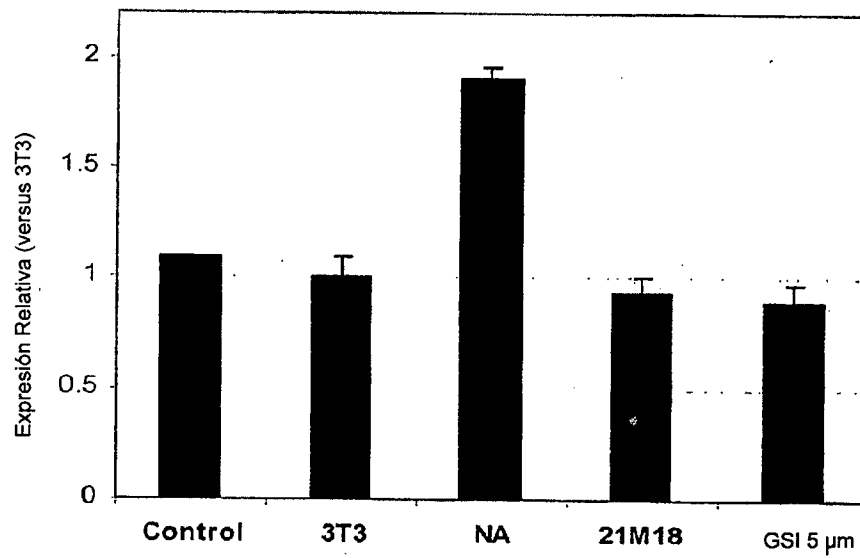
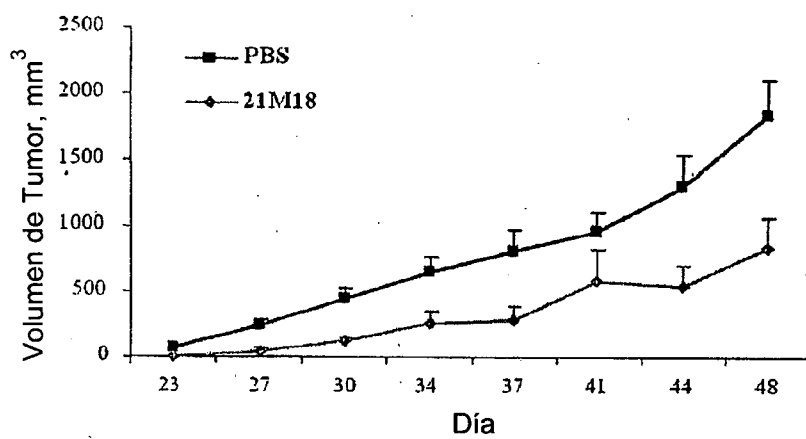


Figura 7B



390
37

Figura 8

Reducción de Tumor = 54 % $p = 0.03$

340

Figura 9



341

Figura 10A

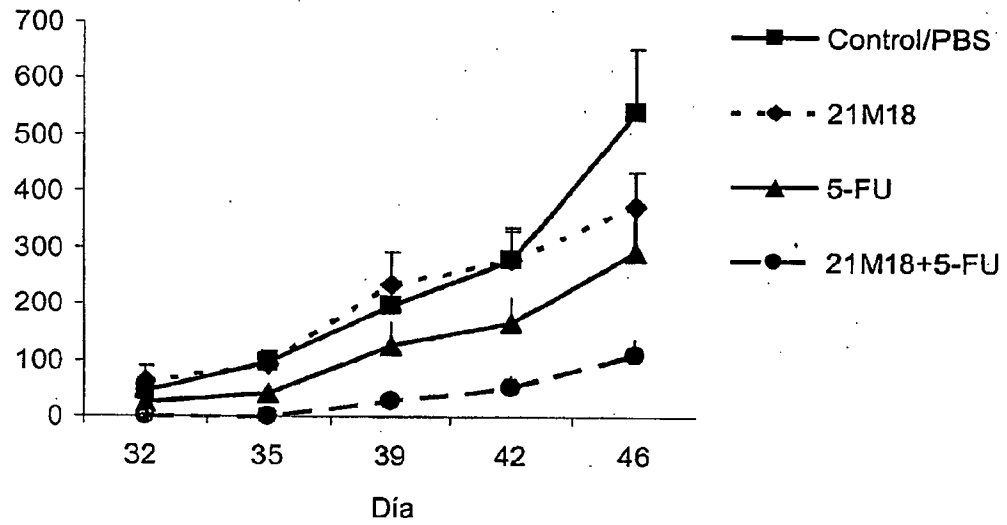
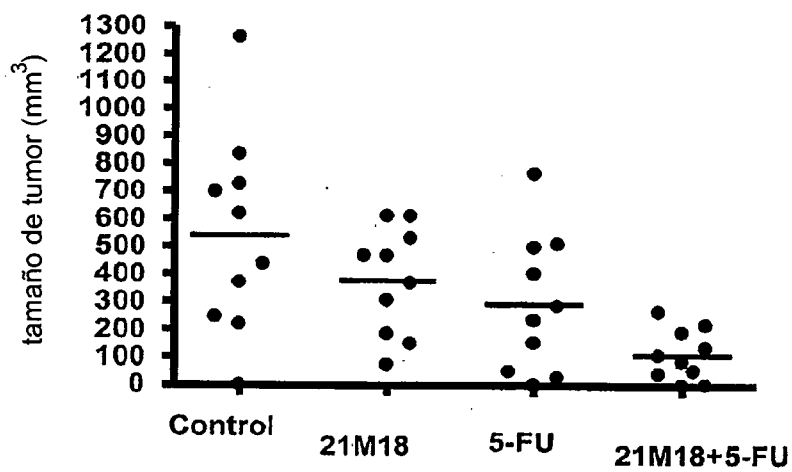
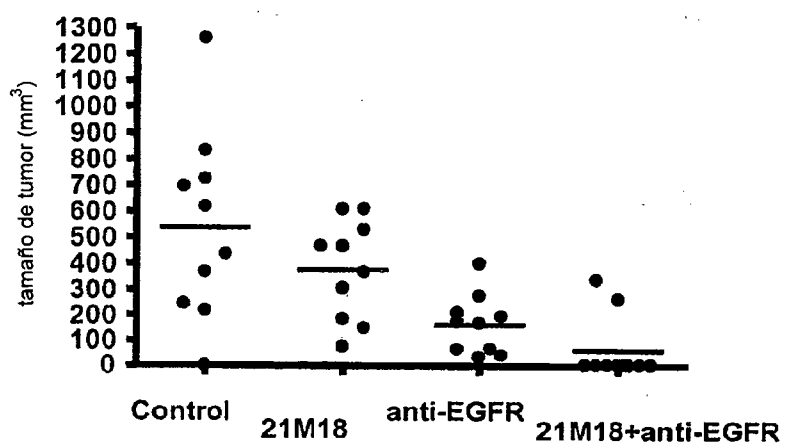


Figura 10B



342

Figura 11



313

Figura 12A

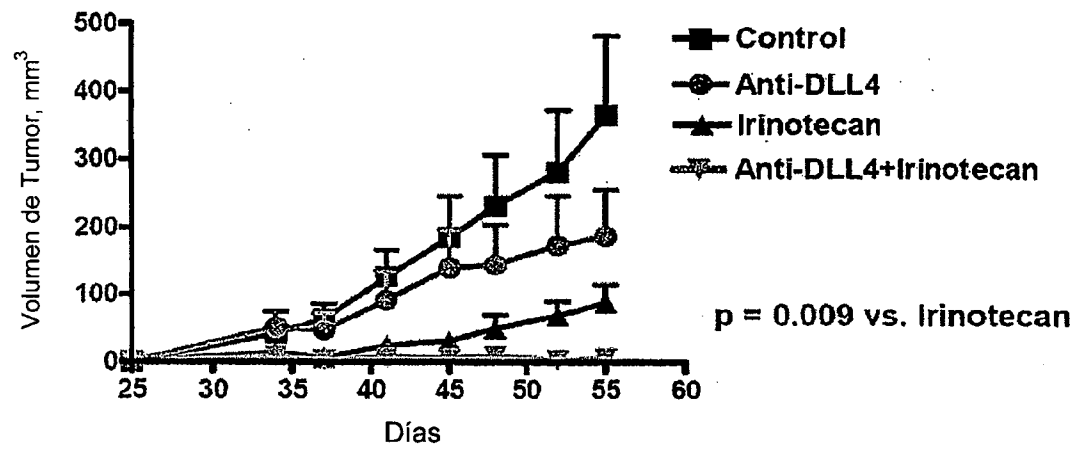
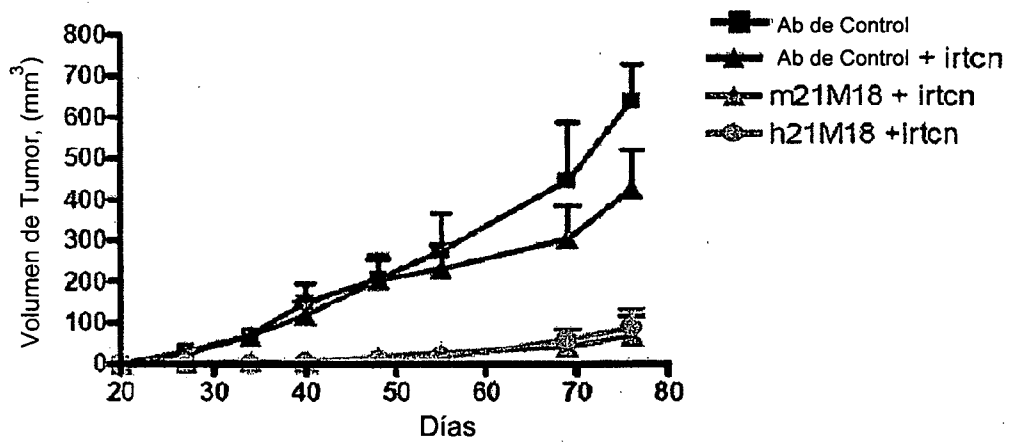
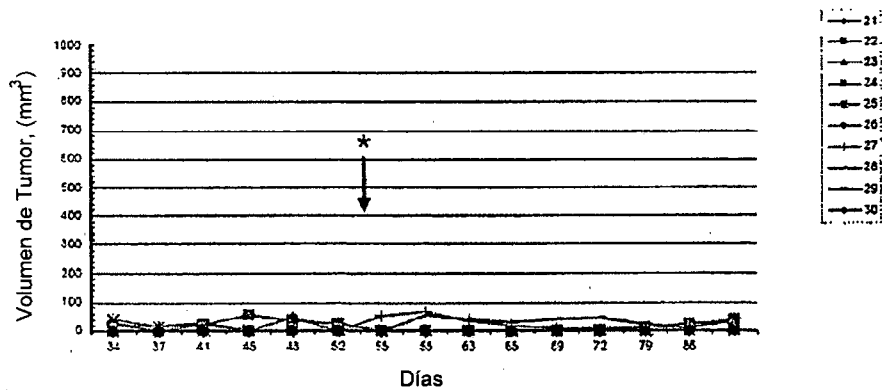


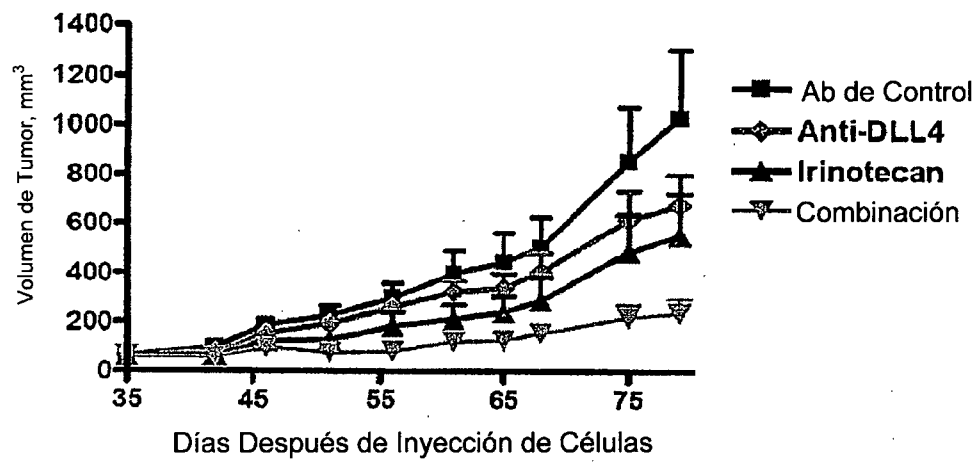
Figura 12B





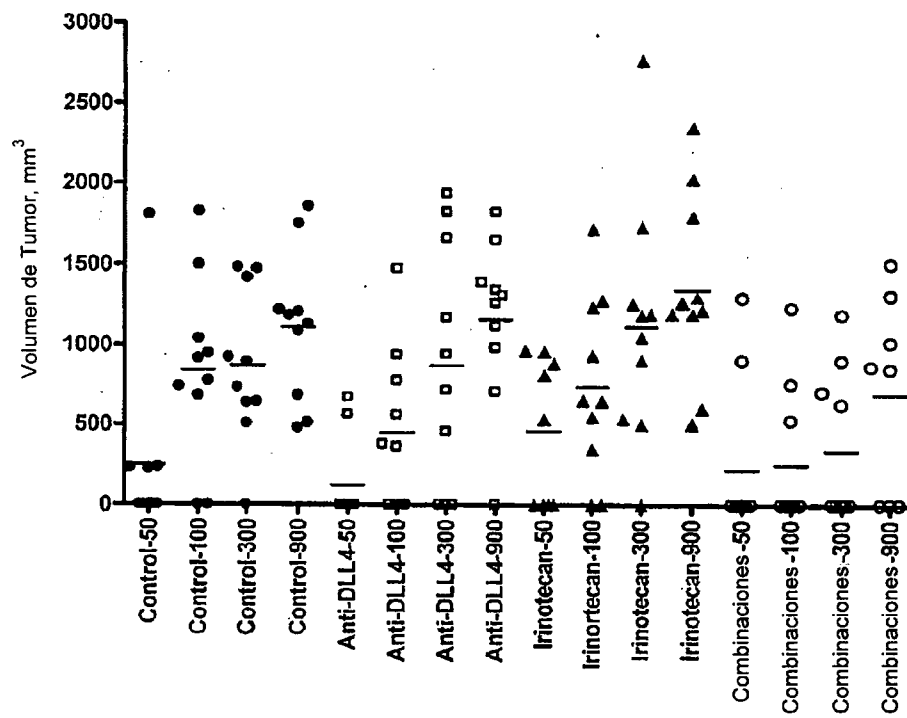
gus

Figura 14



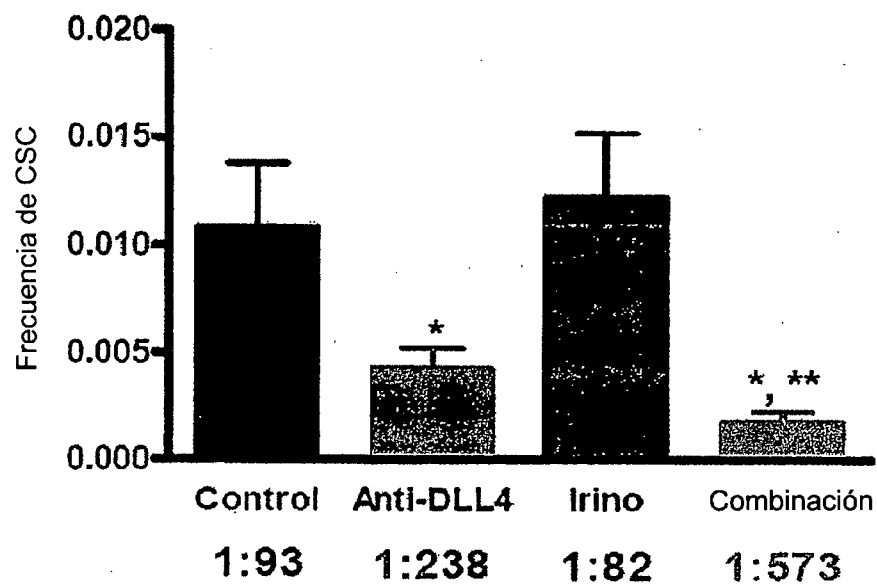
346

Figura 15A



347

Figura 15B

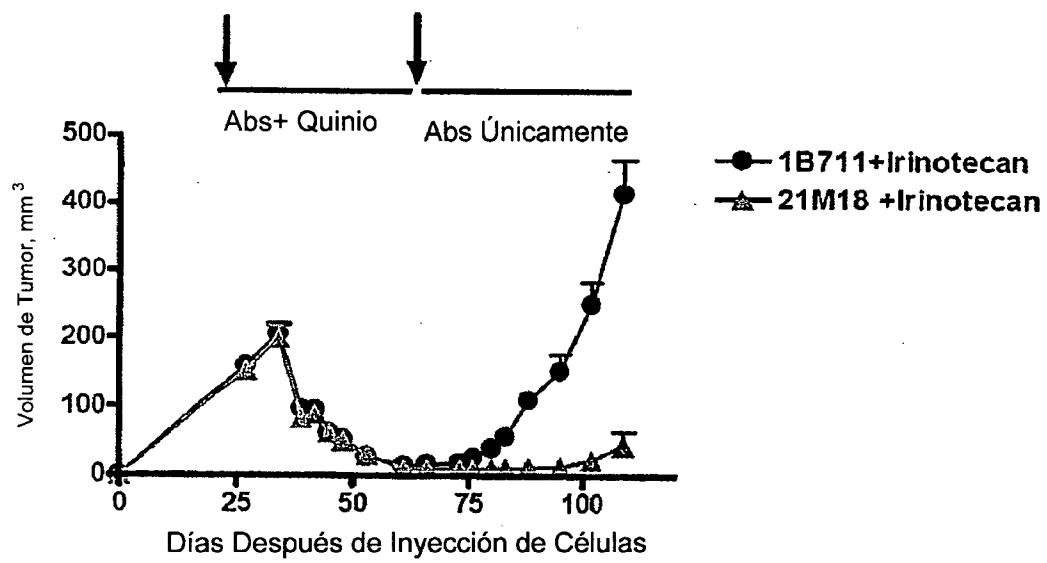


*: $p < 0.05$ vs. Control

** : $p < 0.05$ vs. Irinotecan

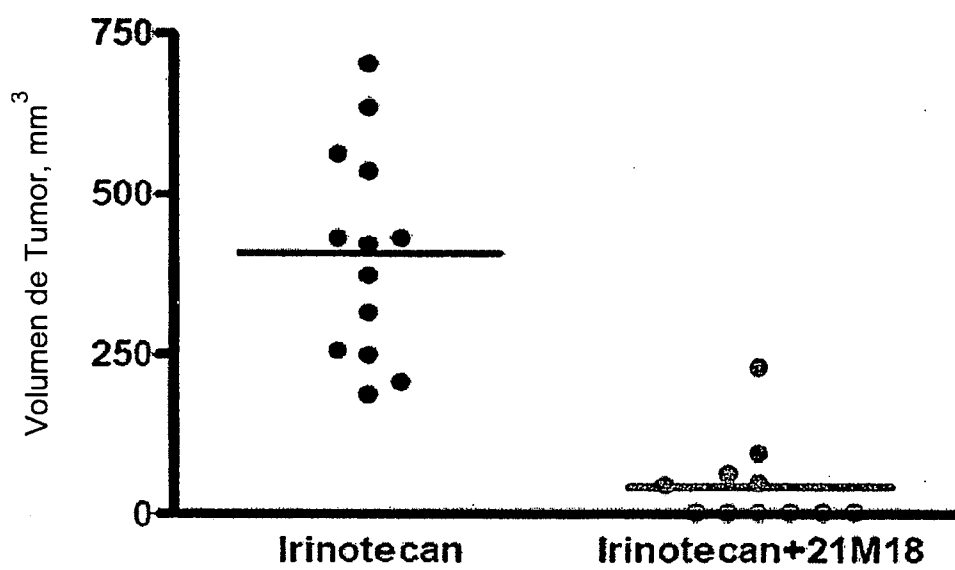
348

Figura 16



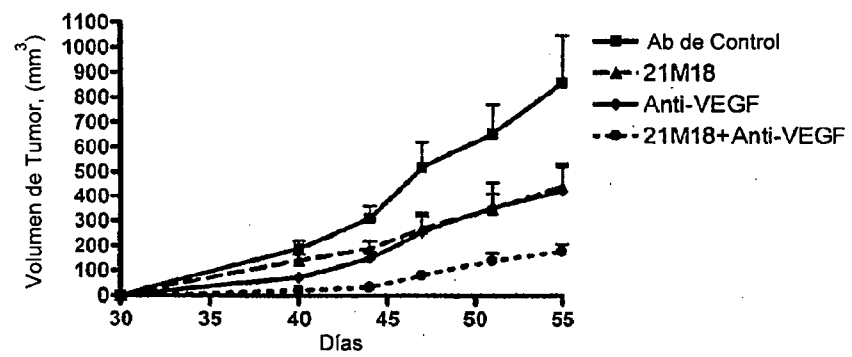
349

Figura 17



350

Figura 18



LISTADO DE SECUENCIAS

351

<110> Oncomed Pharmaceuticals, Inc.

<120> Composiciones y Métodos para Diagnosticar y Tratar Cáncer

<130> 2293.025PC03/KWM/PAC

<150> 60/942,542

<151> 2007-06-07

<150> 60/886,260

<151> 2007-01-23

<150> 60/847,904

<151> 2006-09-29

<160> 27

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada

<400> 1

Thr Ala Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2, H2 de cadena pesada

<400> 2

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 H7 de cadena pesada

<400> 3

Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 H9 de cadena pesada

<400> 4

Tyr Ile Ser Val Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada

<400> 5

Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Val Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable, H2 de cadena pesada

<400> 6

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable, H7 de cadena pesada

<400> 7

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable, H9 de cadena pesada

<400> 8

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Val Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRI de cadena ligera

<400> 9

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Lys
1 5 10 15

<210> 10

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena ligera

<400> 10

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena ligera

<400> 11

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

agb

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable H2 de cadena pesada

<400> 13
 atggactgga cctggagcat cctgttcctg gtggctgctg ctacaggagc tcaactcccag 60
 gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggctagcgt gaagatcagc 120
 tgcaaggcta gcggatactc ctttacagct tactacatcc actgggtgaa gcaggcccct 180
 ggacaagggc tggagtggat cggatatatc agctgttaca acggagctac aaactacaac 240
 cagaagttca agggcagggc caccttcaca acagacacaa gcacaagcac agcctacatg 300
 gagctgagga gcctgagaag cgacgacaca gccgtgtact actgtgctag ggactacgac 360
 tacgacgtgg ggatggacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtcag ctca 414

<210> 14
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial:

<220>
 <223> región variable H7 de cadena pesada

<400> 14
 atggactgga cctggagcat cctgttcctg gtggctgctg ctacaggagc tcaactcccag 60
 gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggctagcgt gaagatcagc 120
 tgcaaggcta gcggatactc ctttacagct tactacatcc actgggtgaa gcaggcccct 180
 ggacaagggc tggagtggat cggatatatc agctcctaca acggagctac aaactacaac 240
 cagaagttca agggcagggc caccttcaca acagacacaa gcacaagcac agcctacatg 300
 gagctgagga gcctgagaag cgacgacaca gccgtgtact actgtgctag ggactacgac 360
 tacgacgtgg ggatggacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtcag ctca 414

<210> 15
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial:

<220>
 <223> cadena pesada H9

<400> 15

atggactgga cctggagcat cctgttcctg gtggctgctg ctacaggagc tcaactcccag	60
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggctagcgt gaagatcagc	120
tgcaaggcta gcgatactc ctttacagct tactacatcc actgggtgaa gcaggccct	180
ggacaagggc tggagtggat cggatatatc agcgtctaca acggagctac aaactacaac	240
cagaagttca agggcagggc caccttcaca acagacacaa gcacaagcac agcctacatg	300
gagctgagga gcctgagaag cgacgacaca gccgtgtact actgtgctag ggactacgac	360
tacgacgtgg ggatggacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtcag ctca	414

<210> 16
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera

<400> 16	
atgggtgctcc agaccaggt cttcatttcc ctgctgctct ggatcagcgg agcctacggg	60
gacatcgtga tgaccagtc ccctgactcc ctggctgtgt ccctgggcca gagggccacc	120
atctcctgca gagccagcga atccgtcgat aattatggca tttcctttat gaagtgggtc	180
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacg ctgcatccaa ccaagggctc	240
ggggtccttg acaggttctc cggcagcggg tccggaacag atttcaactct caccatcagc	300
agcctgcagg ctgaagatgt ggctgtctat tactgtcagc aaagcaagga ggtgccttgg	360
acattcggag gagggacca ggtggaaatc aaacgtacgg tggctgcccc ctccgtcttc	420
atcttcccc ccagcgatga gcagctgaaa agcggcactg ccagcgtggg gtgcctgctg	480
aataacttct atccccggga ggccaaagtg cagtggaagg tggataacgc cctccaaagc	540
ggcaactccc aggagagcgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
agcacctga ccctgagcaa agccgactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	660
acccatcagg gcctgagcag ccccgtcaca aagagcttca acaggggcca gtgttga	717

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

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada

<400> 17
 acagcttact acatccac

356

<210> 18
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2, H2 de cadena pesada

<400> 18
atatcagctg ttacaacgga gctacaaact acaaccagaa gttcaagggc

50

<210> 19
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2, H7 de cadena pesada

<400> 19
atatcagctc ctacaacgga gctacaaact acaaccagaa gttcaagggc

50

<210> 20
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2, H9 de cadena pesada

<400> 20
atatcagcgt ctacaacgga gctacaaact acaaccagaa gttcaagggc

50

<210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada

<400> 21
agggactacg actacgacgt ggggatggac tac

33

<210> 22
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 22
agagccagcg aatccgtcga taattatggc atttccttta tgaag

45

<210> 23

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

<220>
 <223> CDR2 de cadena ligera

<400> 23
 gctgcatcca accaagggtc c

21

<210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena ligera

<400> 24
 cagcaaagca aggaggtgcc ttggacattc ggagga

36

<210> 25
 <211> 522
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

360

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

361

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

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
515 520

<210> 26
<211> 63
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg
20 25 30

Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro
35 40 45

Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys
50 55 60

36

<210> 27
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

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
 145 150

Número de referencia del solicitante o archivo del agente	2293.025PC03	Solicitud internacional No. PCT/US2007/020889
--	--------------	--

**INDICACIONES QUE SE REFIEREN A UN MICROORGANISMO DEPOSITADO
U OTRO MATERIAL DEPOSITADO
(Regla 13bis del PCT)**

A. Las indicaciones hechas posteriormente se refieren al microorganismo referido en la descripción en la página <u>82</u> , renglón <u>14</u>	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO Se identifican depósitos adicionales en una hoja adicional ☐	
Nombre de institución depositaria American Type Culture Collection	
Dirección de institución depositaria (incluyendo código postal y país) P.O. Box. 1549 Manassas, VA 20108 US	
Fecha de depósito 28 de Septiembre de 2007 (28.09.2007)	Número de Acceso PTA-8670
C. INDICACIONES ADICIONALES Esta información se continúa en una hoja adicional ☐ (dejar en blanco si no es aplicable)	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN INDICACIONES (si las indicaciones no son para todos los Estados designados)	
E. PRESENTACIÓN SEPARADA DE INDICACIONES (dejar en blanco signos aplicables)	
Las indicaciones listadas a continuación se presentarán a la Oficina Internacional posteriormente (especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo "Número de Acceso de Depósito")	

Para uso exclusivo de Oficina receptora
☐ Esta hoja se recibió con la solicitud internacional
Funcionario autorizado

Para uso exclusivo de Oficina Internacional
☐ Esta hoja se recibió por la Oficina Internacional el: 21 de diciembre de 2007
Funcionario autorizado

Applicant's or agent's file reference 2293.025PC03	International application No. PCT/US2007/020889
--	--

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>82</u> , line <u>14</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	
Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108 US	
Date of deposit 28 September 2007 (28.09.2007)	Accession Number PTA-8670
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
This information is continued on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on: 21 December 2007
Authorized officer	Authorized officer

ATCC

10801 University Blvd · Manassas, VA 20110-2209 · Teléfono: 703-365-2700 · Fax: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST PARA EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE PROCEDIMIENTO DE PATENTE
FORMA INTERNACIONAL
RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EMITIDO DE ACUERDO A LA REGLA 7.3 Y
DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EMITIDA DE ACUERDO A LA REGLA 10.

Para: (Nombre y Dirección de Depositante o Abogado)

OncoMed Pharmaceuticals
ATTN: Austin Gurney
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063

Depositado a nombre de: OncoMed Pharmaceuticals

Referencia de Identificación por Depositante:
Plásmido de ADN: 21M18H7L2

Designación de Depósito de Patente
PTA-8425

El depósito se acompañó por: X una descripción científica ____ una descripción taxonómica sugerida indicada posteriormente. El depósito se recibió el: 10 de Mayo de 2007 por esta Autoridad Depositaria Internacional y se ha aceptado.

A SU PETICIÓN: X Se le informará de peticiones para la cepa durante 30 años.

La cepa se hará disponible si una oficina de patentes firmante del Tratado de Budapest certifica a alguien el derecho de recibir o si se emite una Patente de los Estados Unidos citando la cepa, y la ATCC se instruye por la Oficina Norteamericana de Patentes y Marcas o el depositante para liberar la cepa.

Si el cultivo muere o se destruye durante el término efectivo del depósito, será responsabilidad reemplazarlo con cultivo vivo del mismo.

La cepa se mantendrá durante un periodo de al menos 30 años desde la fecha de depósito, o cinco años después de la petición más reciente para una muestra, cualquiera que sea más prolongado. Los Estados Unidos y muchos otros países son firmantes al Tratado de Budapest.

La viabilidad del cultivo citado anteriormente se probó el 24 de mayo de 2007. En esa fecha, el cultivo era viable.

Autoridad Depositaria Internacional: Colección Americana de Cultivo de Especies, Manassas, VA 20110-2209 EUA.

Firma de persona que tiene autoridad para representar la ATCC:

(Rúbrica)

Dee Bishop ATTC, Depositario de Patentes

Fecha: 30 de Mayo de 2007

Cc; Stern, Kessler, Goldsein & Fox

Ref: Documento o Caso #: 2293.0220002

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE****INTERNATIONAL FORM****RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2****To: (Name and Address of Depositor or Attorney)**

OncoMed Pharmaceuticals
ATTN: Austin Gurney
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063

Deposited on Behalf of: OncoMed Pharmaceuticals**Identification Reference by Depositor:****Plasmid DNA: 21M18 H7L2****Patent Deposit Designation****PTA-8425**

The deposit was accompanied by: ☒ a scientific description ___ a proposed taxonomic description indicated above.

The deposit was received May 10, 2007 by this International Depository Authority and has been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested May 24, 2007. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Dee Bishop
Dee Bishop, ATCC Patent Depository

Date: May 30, 2007

cc: Stern, Kessler, Goldsein & Fox
Ref: Docket or Case #: 2293.0220002

ATCC

10801 University Blvd · Manassas, VA 20110-2209 · Teléfono: 703-365-2700 · Fax: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST PARA EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE PROCEDIMIENTO DE PATENTE
FORMA INTERNACIONAL
RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EMITIDO DE ACUERDO A LA REGLA 7.3 Y
DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EMITIDA DE ACUERDO A LA REGLA 10.

Para: (Nombre y Dirección de Depositante o Abogado)

OncoMed Pharmaceuticals
ATTN: Austin Gurney
800 Chesapeake Drive
Redwood city, CA 94063

Depositado a nombre de: OncoMed Pharmaceuticals

Referencia de Identificación por Depositante:

ADN de plásmido: 13M57 L21H5
ADN de plásmido: 13M57 L6H5
ADN de plásmido: 21M18 H9L2

Designación de Depósito de Patente

PTA-8424
PTA-8426
PTA-8427

El depósito se acompañó por: ☒ una descripción científica ____ una descripción taxonómica sugerida indicada posteriormente. El depósito se recibió el: 10 de Mayo de 2007 por esta Autoridad Depositaria Internacional y se ha aceptado.

A SU PETICIÓN: ☒ Se le informará de peticiones para la cepa durante 30 años.

La cepa se hará disponible si una oficina de patentes firmante del Tratado de Budapest certifica a alguien el derecho de recibir o si se emite una Patente de los Estados Unidos citando la cepa, y la ATCC se instruye por la Oficina Norteamericana de Patentes y Marcas o el depositante para liberar la cepa.

Si el cultivo muere o se destruye durante el término efectivo del depósito, será responsabilidad reemplazarlo con cultivo vivo del mismo.

La cepa se mantendrá durante un período de al menos 30 años desde la fecha de depósito, o cinco años después de la petición más reciente para una muestra, cualquiera que sea más prolongado. Los Estados Unidos y muchos otros países son firmantes al Tratado de Budapest.

La viabilidad del cultivo citado anteriormente se probó el 23 de mayo de 2007. En esa fecha, el cultivo era viable.

Autoridad Depositaria Internacional: Colección Americana de Cultivo de Especies, Manassas, VA 20110-2209 EUA.

Firma de persona que tiene autoridad para representar la ATCC:

(Rúbrica)

Dee Bishop ATTC, Depositario de Patentes

Fecha: 30 de Mayo de 2007

Cc; Stern, Kessler, Goldsein & Fox

Ref: Documento o Caso#: 2293.0220002; 2293.0220002; 2293.0250001

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE****INTERNATIONAL FORM****RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.****To: (Name and Address of Depositor or Attorney)**

OncoMed Pharmaceuticals

ATTN: Austin Gurney

800 Chesapeake Drive

Redwood city, CA 94063

Deposited on Behalf of: OncoMed Pharmaceuticals**Identification Reference by Depositor:**

Plasmid DNA: 13M57 L21H5

Plasmid DNA: 13M57 L6H5

Plasmid DNA: 21M18 H9L2

Patent Deposit Designation

PTA-8424

PTA-8426

PTA-8427

The deposits were accompanied by: X a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above.The deposits were received May 10, 2007 by this International Depository Authority and have been accepted.**AT YOUR REQUEST:** X We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

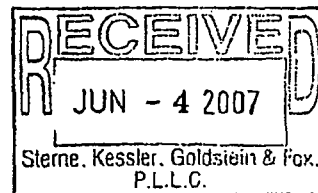
The viability of the cultures cited above was tested May 23, 2007. On that date, the cultures were viable.**International Depository Authority:** American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.**Signature of person having authority to represent ATCC:**

Dee Bishop, ATCC Patent Depository

cc: Stern, Kessler, Goldsein & Fox

Ref: Docket or Case #: 2293.0220002; 2293.0220002; 2293.0250001

Date: May 30, 2007



TWJ

KWM

JAC 6/6/07

TWJ 6/4/07

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

369

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario 2293.025PC03	PARA ACCION ADICIONAL	ver Forma PCT/ISA/220 así como, en donde aplique el inciso 5 posterior
No. de solicitud internacional PCT/US07/20889	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 28 de Septiembre de 2007 (28.09.2007)	(Fecha de Prioridad) (La más cercana) (día/mes/año) 29 de Septiembre de 2006 (29.09.2006)
Solicitante ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.		

Este reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de la Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 18. Se transmite una copia a la Oficina Internacional.

Este reporte de búsqueda internacional consiste de un total de 5 hojas

☐ También está acompañado de una copia de cada documento de la técnica anterior citado en este reporte.

I. Bases del reporte

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se ha llevado a cabo en las bases de:

☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual ha sido presentada.

☐ una traducción de la solicitud internacional _____, que está en el idioma de la traducción proporcionada para los propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☐ Este reporte de Búsqueda internacional se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado a esta autoridad de acuerdo con la Regla 91 (Regla 12.3bis (a)).

c. ☒ Con respecto a cualquier **secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos** descrita en la solicitud internacional, Ver Cuadro No. I

2. ☒ **Ciertas reivindicaciones no se pueden ser el objeto de una búsqueda** (ver el Cuadro II).

3. ☐ **Se carece de unidad de la invención** (ver Cuadro III).

4. Con respecto al **título**,

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante,

☐ esta Autoridad ha establecido que el texto sea como sigue:

5. Con respecto al **resumen**,

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante.

☐ esta Autoridad ha establecido el texto, de acuerdo con la Regla 38.2(b), tal como aparece en el Cuadro IV. El solicitante puede, dentro de un mes a partir de la fecha de envío por correo de este reporte de búsqueda internacional, proporcionar comentarios a esta autoridad.

6. Con respecto a los dibujos

a. la figura de los **dibujos** que se va a publicar con el resumen es: La Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque al solicitante le faltó sugerir una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras ha sido publicada con el resumen

REPORTE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/US 07/20889

Cuadro No. I Secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional y necesariamente a la invención reivindicada, la búsqueda internacional se llevó a cabo en la bases de:

a. tipo de material

- ☒ un listado de secuencias
- ☐ tabla(s) relacionada(s) al listado de secuencias

b. formato del material

- ☒ en la forma escrita
- ☒ en la forma leíble por computadora

c. tiempo de presentación/acabado

- ☐ contenida en la solicitud internacional como se presentó
- ☐ presentada conjuntamente con la solicitud internacional en la forma leíble por computadora

☒ presentada de manera subsecuente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda.

2. ☐ Además, en el caso de más de una versión o copia de un listado de secuencia Y/o tabla que se refiere a la misma se ha presentado o terminado, las declaraciones requeridas que la información en la copia subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud como se presentó o que no va más allá de la solicitud como se presentó, como es apropiado, se presentaron.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Número de Solicitud
Internacional
PCT/US07/20889

Cuadro No. II Observaciones donde ciertas reivindicaciones no fueron localizables
(Continuación del punto 2 de la primera hoja).

Este reporte de búsqueda internacional no se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.: 49-56

debido a que se refieren a materia no requerida para ser buscada por esta Autoridad, específicamente:

Reivindicaciones 49-56 se redactan como reivindicaciones de "uso" no estatutarias

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

Debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos previstos a un grado tal que no se puede llevar una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☒ Reivindicaciones Nos.: 38, 46-63

debido que son reivindicaciones dependientes y no se redactan de acuerdo con el segundo y tercer enunciados de la Regla 6.4(a).

Cuadro No. III. Observaciones donde se carece de la unidad de la invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja).

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. ☐ Puesto que todas las tasas de búsqueda, adicionales requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda cubre todas las reivindicaciones buscables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones buscables podrían ser buscadas sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Autoridad no solicitó el pago de cualquier tasa adicional.
3. ☐ Puesto que únicamente algunas tasas de búsqueda, adicionales, requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ Ninguna de las tasas de búsqueda, adicionales, requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante. En consecuencia, este reporte de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada primero en las reivindicaciones, se cubre por las reivindicaciones Nos.:

Comentario de protesta

- ☐ Las tasas de búsqueda, adicionales se acompañan por la protesta del solicitante.
- ☐ Ninguna protesta acompaña al pago de las tasas de búsqueda, adicionales.
- ☐ Las tasas de búsqueda, adicionales se acompañan por la protesta del solicitante y, donde es aplicable el pago de la tasa de protesta.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional
PCT/US07/20889

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADO IPC (8) - C07K 16/00 (2006.01); C12P 21/08 (2006.01); C07H 21/04 (2006.01); C12N 15/00 (2006.01) USPC - 530/387.1, 387.3, 388,24; 424/130.1, 145.1; 435/69.6, 70.21, 320.1; 536/23.53 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o tanto la clasificación nacional como la IPC.		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación) USPC - 530/387.1, 387.3, 388,24; 424/130.1, 133.1, 145.1; 435/69.6, 70.21, 320.1; 536/23.53 Documentación buscada diferente de la documentación mínima, al grado que estos documentos se incluyen en los campos buscados.		
Base de datos, electrónica, consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, donde se puede practicar, términos de búsqueda usados). <i>Favor de Ver Hoja de Continuación</i>		
C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES		
Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
A	NOGUERA-TROISE I. et al Blockade of DLL4 inhibits Tumor Growth by Promoting Non-productive Angiogenesis. Nature, Diciembre de 2006, Vol. 444, páginas 1032-1037, ver documento completo	1-37, 39-45
A	RIDGWAY J. et al, Inhibition of DLL4 Signalling Inhibits Tumor Growth by Dereglulating Angiogenesis. Nature. Diciembre de 2006, Vol. 444, páginas 1082-1037, ver documento completo.	1-37, 39-45
A	THURSTON G. et al. The Delta Paradox: DLL4 Blockade leads to More Tumor Vessels but Less Tumor Growth. Nature Reviews Cancer. Mayo de 2007, vol. 7, páginas 327-331, ver documento completo	1-37, 39-45
☐ Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.		☐ Los miembros de la familia de patentes se listan en el anexo
* Categoría especial de los documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica, que no se considera que es de pertinencia particular "E" Documento anterior, pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional "L" documento que puede crear dudas de la reivindicación(es) de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (como se especifique) "O" documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada "T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o la fecha de prioridad, y que no provoca conflicto con la solicitud, pero se cita para entender el principio o teoría que trata la invención "X" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar nueva o no se puede considerar que comprende un actividad inventiva cuando el documento se toma solo "Y" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar que comprende un actividad inventiva cuando el documento se combina con uno o más de estos documentos, estas combinaciones son obvias para una persona experta en la técnica "&" documento miembro de la familia de patentes		
Fecha de la actual terminación de la búsqueda internacional 14 de Marzo de 2008 (14.03.2008)		Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional 09 de Abril de 2008
Nombre y dirección de envío de la ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Comisionado para Patentes P.O. Box. 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 No. de Facsimile 571 273-3201		Funcionario autorizado David J. Blanchard Teléfono No. (572) 272-0501

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Número de Solicitud
Internacional

PCT/US07/20889

Continuación de B.CAMPOS BUSCADOS Punto 3:

WEST, medline, embase, esbiobase, scisearch, lifesci, biosis, biotechno, geneseq, uniprot, pir 80, patentes emitidas y solicitudes publicadas

Términos buscados: números de SEQ ID, ligando 4 tipo delta (DLL4), VGEF, ligando/señalización de notch, números de ATCC, búsqueda de inventores

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la AUTORIDAD DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:
KEVIN W. MCCABE
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX P.L.L.C.
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 2000-3934

PCT

**OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD
ENCARGADA DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
(Regla 43bis.1 de PCT)**

Fecha de envío: (día/mes/año)

09 de Abril de 2008

Referencia al expediente del Solicitante o Mandatario
2293.25PC03

**PARA ACCION ADICIONAL
Ver Párrafo 2 más adelante**

Número de Solicitud Internacional:
PCT/US07/20889

Fecha de Presentación Internacional: (día/mes/año)
**28 de Septiembre de 2007
(28.09.2007)**

Fecha de prioridad (día/mes/año)
**29 de Septiembre de 2006
(29.09.2006)**

Clasificación Internacional de Patente (IPC) o tanto la clasificación internacional como la IPC
IPC (8) - C07K 16/00 (2006.01); C12P 21/08 (2006.01); C07H 21/04 (2006.01); C12N 15/00 (2006.01)
USPC - 530/387.1, 387.3, 388.24; 424/130.1, 133.1, 145.1; 435/69.6, 70.21, 320.1; 536/23.53

Solicitante:
ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.

1. Este reporte contiene las indicaciones que están relacionadas con los siguientes puntos:

- ☒ Cuadro No. I Base del reporte
- ☐ Cuadro No. II Prioridad
- ☒ Cuadro No. III Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, actividad inventiva, o aplicabilidad industrial
- ☐ Cuadro No. IV Carencia de unidad de la invención
- ☒ Cuadro No. V Declaración razonada de acuerdo con la Regla 66.2 con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; las citas y explicaciones que soportan tal declaración
- ☐ Cuadro No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Cuadro No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☐ Cuadro No. VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

2. ACCIÓN ADICIONAL

Si se hace una solicitud para un examen preliminar internacional, esta opinión se considerará que es una opinión escrita de la Autoridad del Examen Preliminar Internacional ("IPEA") sin embargo, esto no aplica donde el solicitante elige una autoridad diferente de esta para ser la IPEA y la IPEA elegida ha notificado a la Oficina Internacional de acuerdo con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Encargada de la Búsqueda Internacional.

Si esta opinión se considera, como se proporciona anteriormente, que es una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar a la IPEA una contestación escrita conjuntamente, donde sea apropiado, con enmiendas, antes del vencimiento de los 3 meses desde la fecha de envío de la forma PCT/ISA/220 o antes del vencimiento de los 22 meses desde la fecha de prioridad, cualquiera que expire posteriormente.

Para opciones adicionales, ver la forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de envío de la ISA/US
Comisionado de Patentes y Marcas
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
P.O. Box. 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
No. de Facsimile (571) 273-3201

Fecha del complemento de
la opinión

14 de Marzo de 2008
(14.03.2008)

Oficial Autorizado

David J. Blanchard

Teléfono No. (572) 272-0501

Forma PCT/ISA/237 (Hoja de Cubierta) (Abril de 2007)

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD ENCARGADA
DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/US07/20889

Cuadro No. I Bases de esta opinión

1. Con respecto al **idioma**, esta opinión se ha establecido en las bases de:
- ☒ Esta opinión se ha establecido en la base de la traducción del idioma original en el siguiente idioma,
☐ que una traducción de la solicitud internacional en _____, que es el idioma de la traducción proporcionada para los propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. ☐ Esta opinión se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado por esta Autoridad de acuerdo con la Regla 91 (Regla 43bis.1(a)).
3. con respecto a cualquier **secuencia de nucleótido y/o aminoácidos** descrita en la solicitud internacional y necesaria a la invención reivindicada, se ha establecido esta opinión en base a:
- a. tipo de material
- ☒ un listado de secuencias
☐ tabla(s) relacionada(s) al listado de secuencias
- b. formato del material
- ☒ en la forma escrita
☒ en la forma leíble por computadora
- c. tiempo de presentación/acabado
- ☐ contenida en la solicitud internacional como se presentó
☐ presentada conjuntamente con la solicitud internacional en la forma leíble por computadora
☒ presentada de manera subsecuente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda.
4. ☐ Además, en el caso de más de una versión o copia de un listado de secuencia Y/o tabla que se refiere a la misma se ha presentado o terminado, las declaraciones requeridas que la información en la copia subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud como se presentó o que no va más allá de la solicitud como se presentó, como es apropiado, se presentaron.
5. Comentarios adicionales:

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD ENCARGADA
DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/US07/20889

Cuadro No. III No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial.

I. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece que es nueva, que comprende un actividad inventiva (que sea obvio),
que es aplicable industrialmente no serán examinadas a respecto de:

- ☐ la solicitud internacional completa
☒ reivindicaciones Nos. 38 y 46-63

debido:

☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 49-56 se relacionan al siguiente tema que no requiere un examen preliminar internacional (especifica):

Las reivindicaciones 49-56 se redactan como reivindicaciones de "uso" no estatutarias y no se exponen de manera adecuada los pasos de proceso

☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (indicar los elementos particulares a continuación) o las reivindicaciones Nos. 38 y 46-63 no son claras de modo que no se puede formar una opinión significativa:

Las reivindicaciones 38 y 46-63 son reivindicaciones dependientes, múltiples que dependen de otra reivindicación dependiente, múltiples y como tal no se redactan de acuerdo con la Regla 4.6(a) del PCT.

☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos.: _____ se soportan inadecuadamente por la descripción de modo que no se puede formar una opinión significativa.

☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para las reivindicaciones Nos.

☐ el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos no cumple con la norma provista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

☐ se proporciona un listado de secuencia en papel que cumple con la norma prevista por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y este listado no está disponible para la Autoridad del Examen Preliminar Internacional en la forma y manera aceptables.

☐ se proporciona un listado de secuencia en forma electrónica que cumple con la norma prevista por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y este listado no está disponible para la Autoridad del Examen Preliminar Internacional en la forma y manera aceptables.

☐ pagar la tasa de retraso requerida, provista para la provisión del listado de secuencias en respuesta a la invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).

☐ una opinión significativa no se podría formar sin las tablas que se relacionan a los listados de secuencia, el solicitante no habría, dentro del tiempo límite vencido, proporcionado estas tablas en la forma electrónica cumpliendo con los requerimientos técnicos provistos por el Anexo C-bis de las Instrucciones administrativas, y estas tablas no serán disponibles para la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en la forma y manera aceptables.

☐ las tablas que se relacionan al listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si en la forma leíble por computadora sólo, no cumplen con los requerimientos técnicos provistos por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver hoja separada para detalles adicionales

**OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD ENCARGADA DE
LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US07/20889

V. Declaración razonada bajo la Regla 43 bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva o la aplicabilidad industrial; en las citaciones y explicaciones que soportan tal declaración

1. DECLARACION.

Novedad (N)	Reivindicaciones	<u>1-37 y 39-45</u>	SI
	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	NO
Actividad	Reivindicaciones	<u>1-37 y 39-45</u>	SI
Inventivo (PI)	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	NO
Aplicabilidad	Reivindicaciones	<u>1-37 y 39-45</u>	SI
Industrial (AI)	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	NO

2. Citas y explicaciones:

Las reivindicaciones 1-37 y 39-45 cumplen con los criterios establecidos en el Artículo 33(2)-(3), debido a que la técnica anterior no enseña ni sugiere claramente un anticuerpo aislado que sea específicamente un epítipo de DLL4 humanos citados en las reivindicaciones, o los anticuerpos específicos que tienen las secuencias de cadena pesada y ligera. Las CDR o las especies de anticuerpo producidas por el híbrido que tienen el número de acceso de ATCC PTA-8670 o la especie de anticuerpo purificada por el plásmido depositado con la ATCC como PTA-8425 o PTA-8427.

Las reivindicaciones 1-37 y 39-45 cumplen con los criterios establecidos en el Artículo 33(4) del PCT, y de esta manera tiene aplicabilidad industrial debido a que la materia reivindicada se puede hacer o usar en la industria.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
KEVIN W. MCCABE
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX P.L.L.C.
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-3934

PCT

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

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 2293.025PC03	Date of mailing (day/month/year) 09 APR 2008
International application No. PCT/US07/20889	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below International filing date (day/month/year) 28 September 2007 (28.09.2007)
Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.	

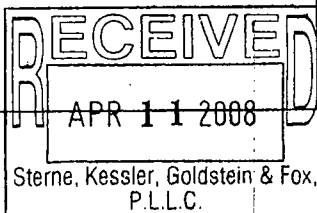
- ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.
Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):
When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.
Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70.
For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
- ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
- ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
- Reminders**
Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.
The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.
Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.
In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.
See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/ US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201
Form PCT/ISA/220 (January 2004)

Authorized officer

David J. Blanchard

Telephone No. (572) 272-0501



Sterne, Kessler, Goldstein & Fox,
P.L.L.C.

DOCKETED

(See notes on accompanying sheet)

Response to Search 6/9/08
Rule 15b IDS 5/9/08
(Stat Rev 7/9/08)
Chap I- Informal Comm
1/25/09
Chap II- Written Opinion
7/25/08

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2293.025PC03	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US07/20889	International filing date (day/month/year) 28 September 2007 (28.09.2007)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29 September 2006 (29.09.2006)
Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.		

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

This international search report consists of a total of 5 sheets.

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

1. Basis of the Report

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



the international application in the language in which it was filed.



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

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

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

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant.



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

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.



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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/20889

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

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

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/20889

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 49-56
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 49-56 are drafted as non-statutory "use" claims
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 38, 46-63
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/20889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 16/00(2006.01);C12P 21/08(2006.01);C07H 21/04(2006.01);C12N 15/00(2006.01) USPC: 530/387.1,387.3,388.24;424/130.1,133.1,145.1;435/69.6,70.21,320.1;536/23.53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.1,387.3,388.24;424/130.1,133.1,145.1;435/69.6,70.21,320.1;536/23.53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOGUERA-TROISE I. et al. Blockade of Dll4 inhibits Tumor Growth by Promoting Non-productive Angiogenesis. Nature. December 2006, Vol 444, pages 1032-1037, see entire document.	1-37, 39-45
A	RIDGWAY J. et al. Inhibition of Dll4 Signalling Inhibits Tumor Growth by Dereulating Angiogenesis. Nature. December 2006, Vol 444, pages 1083-1087, see entire document.	1-37, 39-45
A	THURSTON G. et al. The Delta Paradox: DLL4 Blockade Leads to More Tumor Vessels but Less Tumour Growth. Nature Reviews Cancer. May 2007, Vol 7, pages 327-331, see entire document.	1-37, 39-45
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 March 2008 (14.03.2008)	Date of mailing of the international search report 09 APR 2008	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized Officer David J. Blanchard Telephone No. (572) 272-0501	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/20889

EB

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, medline, embase, esbiobase, scisearch, lifesci, biosis, biotechno, geneseq, uniprot, pir 80, issued patents and published applications
Search terms: SEQ ID numbers, delta-like ligand 4 (DLL4), VEGF, notch ligand/signaling, ATCC numbers, inventor search

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
KEVIN W. MCCABE
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX P.L.L.C.
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-3934

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

364

Applicant's or agent's file reference 2293.025PC03		Date of mailing (day/month/year) 09 APR 2008
International application No. PCT/US07/20889		International filing date (day/month/year) 28 September 2007 (28.09.2007)
Priority date (day/month/year) 29 September 2006 (29.09.2006)		
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC: C07K 16/00(2006.01);C12P 21/08(2006.01);C07H 21/04(2006.01);C12N 15/00(2006.01) USPC: 530/387.1,387.3,388.24;424/130.1,133.1,145.1;435/69.6,70.21,320.1;536/23.53		
Applicant ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.		

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

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

2. FURTHER ACTION

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA/ US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Date of completion of this opinion 14 March 2008 (14.03.2008)	Authorized officer David J. Blanchard Telephone No. (572) 272-0501
--	---	--

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2007)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/20889

Box No. I Basis of this opinion

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

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/20889

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

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

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 38 and 46-63

because:

☒ the said international application, or the said claim Nos. 49-56 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

Claims 49-56 are drafted as non-statutory "use" claims and do not adequately set forth process steps

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 38 and 46-63 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 38 and 46-63 are multiple dependent claims that depend from another multiple dependent claim and as such are not drafted in accordance with PCT Rule 4.6(a)

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

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

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

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

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

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

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

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

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US07/20889

38

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement		
1. Statement		
Novelty (N)	Claims 1-37 and 39-45	YES
	Claims NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims 1-37 and 39-45	YES
	Claims NONE	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-37 and 39-45	YES
	Claims NONE	NO
2. Citations and explanations:		
Claims 1-37 and 39-45 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest an isolated antibody that specifically binds to the human DLL4 epitopes recited in the claims, or the specific antibodies having the recited heavy and light chain sequences, CDRs or the antibody species produced by the hybridoma having ATCC accession No. PTA-8670, or the antibody species encoded by the plasmid deposited with the ATCC as PTA-8425 or PTA-8427. Claims 1-37 and 39-45 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.		

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 April 2008 (10.04.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/042236 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/020889

(22) International Filing Date:
28 September 2007 (28.09.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/847,904 29 September 2006 (29.09.2006) US
60/886,260 23 January 2007 (23.01.2007) US
60/942,542 7 June 2007 (07.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ON-COMED PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 800 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GURNEY, Austin** [US/US]; 496 Diamond Street, San Francisco, CA 94114 (US). **HOEY, Timothy** [US/US]; 200 Darrell Road, Hillsborough, CA 94010 (US). **SATYAL, Sanjeev** [IN/US]; 965 Buckland Avenue, San Carlos, CA 94070 (US). **AXEL-ROD, Fumiko** [US/US]; 3780 Wright Place, Palo Alto, CA 94306 (US).

(74) Agents: **MCCABE, Kevin, W.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (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 (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR DIAGNOSING AND TREATING CANCER

(57) Abstract: An isolated antibody that specifically binds to an extracellular domain of human DLL4 and affects growth of a tumor comprising cancer stem cells is described. Also described is a method of treating cancer comprising administering a therapeutically effective amount of an anti-DLL4 antibody.

WO 2008/042236 A2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/20889

358

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

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

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/20889

390

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 49-56
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 49-56 are drafted as non-statutory "use" claims
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 38, 46-63
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/20889

941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: C07K 16/00(2006.01);C12P 21/08(2006.01);C07H 21/04(2006.01);C12N 15/00(2006.01)

USPC: 530/387.1,387.3,388.24;424/130.1,133.1,145.1;435/69.6,70.21,320.1;536/23.53

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/387.1,387.3,388.24;424/130.1,133.1,145.1;435/69.6,70.21,320.1;536/23.53

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOGUERA-TROISE I. et al. Blockade of Dll4 inhibits Tumor Growth by Promoting Non-productive Angiogenesis. Nature. December 2006, Vol 444, pages 1032-1037, see entire document.	1-37, 39-45
A	RIDGWAY J. et al. Inhibition of Dll4 Signalling Inhibits Tumor Growth by Deregulating Angiogenesis. Nature. December 2006, Vol 444, pages 1083-1087, see entire document.	1-37, 39-45
A	THURSTON G. et al. The Delta Paradox: DLL4 Blockade Leads to More Tumor Vessels but Less Tumour Growth. Nature Reviews Cancer. May 2007, Vol 7, pages 327-331, see entire document.	1-37, 39-45

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2008 (14.03.2008)

Date of mailing of the international search report

09 APR 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized Officer

David J. Blanchard

Telephone No. (572) 272-0501

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/20889

zgt

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, medline, embase, esbiobase, scisearch, lifesci, biosis, biotechno, geneseq, uniprot, pir 80, issued patents and published applications

Search terms: SEQ ID numbers, delta-like ligand 4 (DLL4), VEGF, notch ligand/signaling, ATCC numbers, inventor search



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN 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 ☐

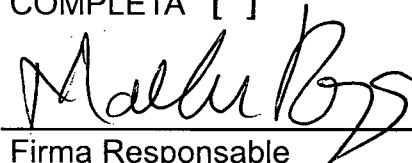
INCOMPLETA ☐

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 ☐


Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha



No. 09-031240- -00000-0000

Fecha: 2009-03-26 17:14:29 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 392

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

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)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

REFERENCIA	Radicación No.	9 31240
	Solicitud internacional	PCT/US2007/020889
	Fecha inicio fase nacional	29/04/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	5124

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 el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. 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.

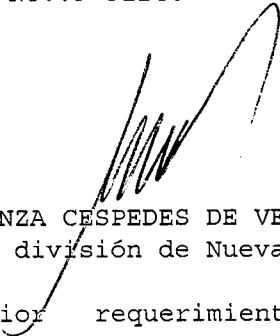
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud 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.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 31240



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 08 MAYO 2009
jfernand