

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 628**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2012 E 18197338 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2022 EP 3485903**

54 Título: **Agentes de unión a VEGF/DLL4 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

23.09.2011 US 201161538454 P

10.02.2012 US 201261597409 P

24.08.2012 US 201261692978 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.04.2023

73 Titular/es:

MEREO BIOPHARMA 5, INC. (100.0%)

800 W El Camino Real Suite 180

Mountain View, CA 94040, US

72 Inventor/es:

GURNEY, AUSTIN L.;

SATO, AARON KEN y

BOND, CHRISTOPHER JOHN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 938 628 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes de unión a VEGF/DLL4 y usos de los mismos

5 **Campo de la Invención**

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

10

Antecedentes de la Invención

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

15

La angiogénesis incluye una familia de proteínas que actúan como activadores angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, por sus siglas en inglés), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E, y sus receptores respectivos (VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3). El VEGF-A, también referido como VEGF o factor de permeabilidad vascular (VPF, por sus siglas en inglés), existe en varias isoformas que surgen del empalme alternativo de ARNm de un gen VEGF individual, con el VEGF₁₆₅ que es la isoforma más biológicamente relevante.

20

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

25

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

30

La trayectoria Notch se ha relacionado con la patogénesis de tumores y cánceres tanto hematológicos como sólidos. Las numerosas funciones celulares y señales microambientales asociadas con la tumorigénesis han mostrado que se modulan por la señalización de la trayectoria Notch, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, adhesión, y angiogénesis (Leong y colaboradores, 2006, *Blood*, 107:2223- 2233). Además, los receptores Notch y/o ligandos Notch han mostrado que desempeñan funciones oncogénicas potenciales en varios cánceres humanos, incluyendo leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda de células T, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de la piel. (Leong y colaboradores, 2006, *Blood*, 107:2223-2233).

35

40

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

45

Los anticuerpos anti-DLL4 han mostrado que mejoran la proliferación y ramificación angiogénica que conduce a la angiogénesis no productiva y crecimiento tumoral disminuido (Noguera-Troise y colaboradores, 2006, *Nature*, 444:1032- 1037). Además, un anticuerpo anti-DLL4, 21M18, ha mostrado que inhibe el crecimiento tumoral y reduce la frecuencia de célula madre cancerosas en modelos de tumor de xenoinjerto (Hoey y colaboradores, 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-177; Patente de E. U. A. No. 7.750.124, documentos US2011/165162: WO20080422361 y en ensayos clínicos (documento WO2012068098: Smith et al (2010) *European Journal of Cancer* 8 7 73)

50

55

Aunque ha habido avances significativos en el desarrollo de anticuerpos monoclonales para el uso en tratamientos del cáncer, existe a un gran potencial para mejoras adicionales. Una clase de moléculas de anticuerpo con la promesa de potencia aumentada y/o efectos secundarios reducidos (por ejemplo, toxicidad) son los anticuerpos biespecíficos (WO2010129304: US2010/0761781 .

60

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

65

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

Sumario de la invención

5 La presente invención se define por las reivindicaciones.

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

25 En un aspecto, la invención proporciona un agente de unión, tal como un anticuerpo, que se une específicamente al VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión inhibe la unión de VEGF a por lo menos un receptor de VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión inhibe la unión de VEGF a VEGFR-1 y/o VEGFR-2. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión modula la angiogénesis. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo u otro agente de unión se unen específicamente además a y/o inhibe el DLL4 humano además del VEGF.

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

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

50 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión es el anticuerpo 219R45, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, o 219R45-MB-21R83.

55 La divulgación también proporciona un agente de unión, tal como un anticuerpo, que se une específicamente a DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión inhibe la unión de DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión inhibe la unión de DLL4 a Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión inhibe la señalización Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión promueve la angiogénesis no productiva. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo u otro agente de unión se unen específicamente además a y/o inhibe el VEGF humano además del DLL4 humano.

60 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión es un anticuerpo que se une al DLL4 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO: 79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX1X2YX3X4ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), en donde Xi es serina o alanina, X2 es serina, asparagina, o glicina, X3 es asparagina o lisina, y X4 es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una

5 CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

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

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión es un anticuerpo 21R79 o anticuerpo 219R45-MB-21R79.

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

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

35 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión es un anticuerpo 21R75 o anticuerpo 219R45-MB-21R75.

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

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

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión es un anticuerpo 21R83 o anticuerpo 219R45-MB-21R83.

55 En ciertas divulgaciones del presente documento de cada uno de los aspectos o realizaciones ya mencionadas, así como otros aspectos y/o realizaciones descritas en cualquier lugar en la divulgación del presente documento, el agente de unión es un anticuerpo biespecífico. Un aspecto de la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que se une específicamente tanto VEGF humano como DLL4 humano, como se establece en la reivindicación 1. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico modula la angiogénesis. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico inhibe la señalización Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico modula la angiogénesis e inhibe la señalización Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico reduce el número de frecuencia de células madre cancerosas. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas. En ciertas divulgaciones del presente documento el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG2).
60

65 En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de unión a

- antígeno que se une específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).
- En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 80), en donde Xi es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina, o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 59) , o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).
- En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO: 79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), en donde Xi es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina, o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina, o ácido aspártico y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de

unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

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

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a DLL4 humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a DLL4 humano, y comprende: una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

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

región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende (a) un primer sitio de unión a antígeno que se une a VEGF humano con una K_D entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 1,0 nM y (b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano con un K_D entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 20 nM. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas.

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

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

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

La divulgación también proporciona moléculas de polinucleótido aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica los agentes de unión y/o polipéptidos divulgados y descritos en el presente documento. En algunas divulgaciones del presente documento, el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, y SEQ ID NO:74. La divulgación proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos, así como células que comprenden los vectores de expresión y/o los polinucleótidos. En algunas divulgaciones del presente documento, la célula es una célula procariótica o una célula eucariótica.

En otros aspectos, la divulgación también proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a VEGF, DLL4, o tanto a VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de esos anticuerpos (u otros agentes de unión) descritos en la presente.

La divulgación también proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de unión) descritos en la presente.

La divulgación también proporciona un método para modular la angiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de unión) descritos en la presente.

La divulgación también proporciona un método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a VEGF, DLL4 o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo a cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de unión) descritos en la presente.

La divulgación también proporciona un método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto al reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a VEGF, DLL4, o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo a cada uno de aquellos anticuerpos (u otros agentes de unión) descritos en la presente.

La divulgación también proporciona métodos para tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a VEGF, DLL4, o a tanto VEGF como a DLL4, incluyendo a cada uno de esos anticuerpos (u otros agentes de unión) descritos en la presente.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de unión (por ejemplo, anticuerpos) descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable se proporcionan adicionalmente, como son líneas de células que

expresan y/o producen los agentes de unión. Los métodos para tratar cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto (por ejemplo, un humano) que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende los agentes de unión también se proporcionan.

- 5 Donde la divulgación del presente documento se describe en términos de un grupo Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención abarca no solamente la totalidad de la lista en su conjunto, sino también cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal, y también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reclamada.

10

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1C. Fig. 1A, CDRs de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21M79, 219R45-MB-21M75, y 219R45-MB-21M83; Fig. 1B) Región variable de cadena pesada y cadena ligera SEQ ID NOs; Fig. 1C) SEQ ID Nos de cadena pesada y cadena ligera. Figura 2. Ensayo HTRF para unión simultánea de anticuerpos biespecíficos al VEGF humano y DLL4 humano. Los resultados se reportan en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU, por sus siglas en inglés), que representa la relación de la intensidad de fluorescencia relativa a 665 nm a la intensidad de fluorescencia relativa a 620 nm. 219R45-MB-21M18 (-*-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 219R45 más 21M18 (-▲-); 219R45 más 21R79 (-□-); 219R45 (-▼-); 21M18 (-○-); 21R79 (-○-); anticuerpo de control LZ-1 (-A-).

Figura 3. Inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF por los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. La intensidad de fluorescencia se lee usando una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de emisión de 590. 219R45-MB-21M18 (-*-); 219R45-MB-21R79 (-▲-); 219R45 (-■-); Medio sin VEGF (-○-).

Figura 4. Inhibición de la señalización Notch inducida por DLL4 por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. La actividad de luciferasa se midió usando un kit de ensayo de luciferasa doble con actividad de luciferasa de Luciérnaga normalizada con la actividad de luciferasa de Renilla. 219R45-MB-21M18 (-*-); 219R45-MB-21R79 (-■-); 21M18 (-○-); 21R79 (-□-).

Figura 5. Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* por un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en un injerto de piel humana en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (-▲-), anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (-○-), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-▼-). Los datos se muestran como volumen de tumor (fotones/sec) durante los días postratamiento. Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 25 mg/kg una vez a la semana.

Figura 6. Tumorigenicidad de células tumorales pancreáticas después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales OMP-PN8 de ratones tratados con anticuerpo de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 con o sin gemcitabina se procesaron a suspensiones de células individuales, y se trasplantaron en serie en ratones. 90 células de cada grupo de tratamiento se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los tumores se dejaron desarrollar sin ningún tratamiento. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) en el día 55. La frecuencia del tumor se muestra como un número de tumores sobre el número total de ratones inyectados en cada grupo.

Figura 7. ELISA de anticuerpo biespecífico. Anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo (1x de PBS, 0,1 % de gelatina, 0,1 % de Polisorbato-20, pH 7.4) que contiene 2 µg/ml de biotina-DLL4-hFc. Los anticuerpos se diluyeron en serie 3 veces de 500 ng/ml a 0,008 ng/ml. Las muestras de anticuerpos se incubaron durante 2 horas en solución amortiguadora de bloqueo que contiene la biotina-DLL4-hFc. Después de la incubación, las muestras de anticuerpos se transfirieron a una placa de ensayo recubierta con VEGF (100 ul/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Se agregó Estreptavidina-HRP a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. El sustrato TMB se agregó a los pocillos con un desarrollo de color de 10 minutos y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se leyó a 450-650 nm y los datos se analizaron usando el ajuste de 4 parámetros dentro del programa de análisis Softmax Pro.

Figura 8. Enfoque isoeléctrico capilar formado en imagen de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4.

Figura 9. Inhibición del crecimiento del tumor del colon por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 en un modelo de recurrencia de tumor. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (-*-), anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (-▲-), una combinación de 21M18 y bevacizumab (-▼-), anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-○-), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 (-○-), todos en combinación con irinotecano. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se administraron intraperitonealmente en una dosis de 7,5 mg/kg una vez a la semana, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se administraron intraperitonealmente en una dosis de 15 mg/kg una vez a la semana, y el irinotecano se administró para las primeras 4 semanas en una dosis de 45 mg/kg. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días postratamiento.

Figura 10. La tumorigenicidad de células tumorales de colon OMP-C3 después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Los tumores de ratones tratados con anticuerpo de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab, una combinación de 21M18 y de bevacizumab, o

anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 con o sin irinotecano se procesaron a suspensiones de células individuales, y se trasplantaron en serie en ratones. 150 células de cada grupo de tratamientos se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los tumores se dejaron desarrollar sin ningún tratamiento. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) en el día 68.

Figuras 11A-11B. Inhibición del crecimiento de tumor de colon *in vivo* por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4. Células tumorales de colon OMP-C8 se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo de control (-■-), anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab (-▲-), o anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 (-○-), 219R45-MB-21R75 (-●-), 219R45-MB-21R79 (-◊-), o 219R45-MB-21R83 (-▼-). Los ratones se trataron con anticuerpos como agentes individuales (Fig. 11A) o en combinación con irinotecano (Fig. 11B). Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 15 mg/kg una vez a la semana e irinotecano en una dosis de 7,5 mg/kg una a la semana. Los datos se muestran como volumen de tumor (mm³) durante los días postratamiento.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona agentes de unión novedosos, que incluyen pero no se limitan a polipéptidos tales como anticuerpos, que se unen a VEGF y/o DLL4 (por ejemplo, un agente de unión VEGF/DLL4). Los polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de unión a VEGF/DLL4, y métodos para elaborar los agentes de unión VEGF/DLL4 también se proporcionan. Métodos para usar los agentes de unión VEGF/DLL4 novedosos, tales como métodos para inhibir el crecimiento tumoral, métodos para tratar el cáncer, métodos para reducir la tumorigenicidad de un tumor, métodos para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor y/o métodos para modular la angiogénesis, se proporcionan adicionalmente.

Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al VEGF humanos se ha identificado, 219R45. Ese anticuerpo tiene una afinidad de unión para el VEGF humano de aproximadamente 0,67 nM, y una afinidad de unión para VEGF de ratón de aproximadamente 23 nM. Varios anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al DLL4 humano se han identificado, 21R79, 21R75 y 21R83. El anticuerpo 21R79 tiene una afinidad de unión para el DLL4 humano de menor que 0,1 nM. Los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente al VEGF humano y al DLL4 humano se han producido, 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 (secuencias CDR en las Figuras 1A-1C). Como se usa en la presente, el "MB" dentro de un nombre de anticuerpo se refiere a "monovalente/biespecífico". El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tiene una afinidad de unión para el VEGF humano de menor que 1,0 nM y una afinidad de unión para el DLL4 de aproximadamente 16 nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tiene una afinidad de unión al VEGF de menor que 1,0 nM y una afinidad de unión para el DLL4 humano de menor que 1,0 nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75 tiene una afinidad de unión para el DLL4 humano de aproximadamente 5 nM, mientras que el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83 tiene una afinidad de unión para el DLL4 humano de aproximadamente 1 nM. Los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se unen al VEGF de ratón (Ejemplo 1, Tabla 3). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se unen al VEGF humano y DLL4 simultáneamente (Ejemplo 2, Figura 2). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC (Ejemplo 3, Figura 3). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la señalización Notch inducida por DLL4 (Ejemplo 4, Figura 4). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben el crecimiento tumoral (Ejemplos 5, 9, 11 y Figuras 5, 9, 11A-11B). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 inhiben la tumorigenicidad (Ejemplos 6 y 10 y Figuras 6, 10). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se unen tanto a VEGF como DLL4 en un ELISA biespecífico (Ejemplo 7, Figura 7). Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se aíslan y purifican a un producto que comprende por lo menos 90 % de anticuerpo heterodimérico (Ejemplo 8, Tabla 7).

I. Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la presente divulgación, varios términos y frases se definen a continuación.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores, a través de por lo menos un sitio de reconocimiento a antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos de cadena individual, fragmento de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv), anticuerpos Fv de cadena individual (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno (es decir, sitio de unión a antígeno) siempre y cuando los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2), basado en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidad diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser desnudos o conjugados a otras moléculas, incluyendo pero no limitado a, toxinas y radioisótopos.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables de determinación antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos de Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena individual, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. "Fragmento de anticuerpo" como se usa en la presente comprende un sitio de unión a antígeno o sitio de unión a epítipo.

El término "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de una cadena ligera de anticuerpo o la región variable de una cadena pesada de anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras consisten cada una de cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) conectadas por tres regiones de determinación de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés), también conocidas como "regiones hipervariables". Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por regiones de estructura y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Existen por lo menos dos técnicas para determinar las CDRs: (1) un procedimiento basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y colaboradores, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, National Institutes of Health, Bethesda, MD), y (2) un procedimiento basado en estudios cristalográficos de complejos de antígenos- anticuerpo (Al-Lazikani y colaboradores, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). Además, las combinaciones de estos dos procedimientos se usan algunas veces en la técnica para determinar la CDRs.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a una población de anticuerpos homogéneos implicados en el reconocimiento y unión sumamente específica de un determinante o epítipo antigénico individual. Esto es en contraste con los anticuerpos monoclonales que incluyen normalmente una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos contra varios determinantes antigénicos diferentes. El término "anticuerpo monoclonal" abarca tanto anticuerpos monoclonales intactos como de longitud completa así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena individual (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno (sitio de unión a antígeno). Adicionalmente, el "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos fabricados por cualquier número de técnicas incluyendo pero no limitado a, producción de hibridoma, selección en fago, expresión recombinante, y animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" como se usa en la presente se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las CDRs se reemplazan por residuos de las CDRs de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, o hámster) que tienen la especificidad deseada, afinidad y/o capacidad de unión (Jones y colaboradores, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann y colaboradores, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeven y colaboradores, 1988, *Science*, 239:1534-1536). En algunos casos, los residuos de región de estructura Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tienen la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de unión. El anticuerpo humanizado se puede modificar además por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar u optimizar la especificidad de anticuerpos, afinidad, y/o capacidad de unión. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen, todo o sustancialmente todo de las CDRs que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas de las regiones de estructura son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, Patente de E.U.A. 5,225,539.

El término "anticuerpo humano" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano. Un anticuerpo humano se puede fabricar usando cualquiera de las técnicas conocidas en el campo. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende CDRs no humanas.

El término "anticuerpo quimérico" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de unión, mientras que las regiones constantes corresponden a las secuencias en los anticuerpos derivados de otras especies (usualmente humano).

La frase "anticuerpo madurado por afinidad" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo que da por resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, comparado con un anticuerpo precursor que no posee esas alteraciones. La definición también incluye alteraciones en los residuos no de CDR hechos en conjunción con las alteraciones a los residuos CDR. Los anticuerpos

- 5 madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares a un picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por los procedimientos conocidos en el campo. Por ejemplo, Marks y colaboradores, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, describe maduración por afinidad mediante transposición de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o los residuos de estructura se describe por Barbas y colaboradores, 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier y colaboradores, 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton y colaboradores, 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson y colaboradores, 1995, *J. Immunol.*, 154:3310-9; y Hawkins y colaboradores, 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede usar para obtener anticuerpos madurados por afinidad.
- 10 Los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se usan intercambiamente en la presente y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocida y una específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítipos se pueden formar tanto de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados de aminoácidos contiguos (también referidos como epítipos lineales) se retienen normalmente en la desnaturalización de la proteína, mientras
- 15 que los epítipos formados por el plegamiento terciario (también referidos como epítipos conformacionales) se pierden normalmente en la desnaturalización de la proteína. Un epítipo incluye normalmente por lo menos 3, y más usualmente, por lo menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.
- 20 Los términos "molécula heteromultimérica" o "heteromultímero" o "complejo heteromultimérico" o "polipéptido heteromultimérico" se usan intercambiamente en la presente para referirse a una molécula que comprende por lo menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido por al menos un residuo de aminoácido. La molécula heteromultimérica puede comprender un "heterodímero" formado por el primero y segundo polipéptido o puede formar estructuras terciarias de orden superior donde están presentes los polipéptidos adicionales.
- 25 Los términos "antagonista" y "antagonístico" como se usa en la presente se refieren a cualquier molécula que bloquea parcial o completamente, inhibe, reduce, neutraliza una actividad biológica de un objetivo y/o rutas de señalización (por ejemplo, la trayectoria Notch). El término "antagonista" se usa en la presente para incluir cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba, reduzca o neutralice la actividad de una proteína. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente, pero no se limitan a, anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpo.
- 30 Los términos "modulación" y "modulan" como se usa en la presente se refiere a un cambio o una alteración en una actividad biológica. La modulación incluye, pero no se limita a, estimular o inhibir una actividad. La modulación puede ser un incremento o una disminución en la actividad (por ejemplo, una disminución en la angiogénesis o un incremento en la angiogénesis), un cambio en las características de unión, o cualquier otro cambio en las propiedades biológicas, funcionales inmunológicas asociadas con la actividad de una proteína, ruta, u otro punto biológico de interés.
- 35 Los términos "se une selectivamente" o "se une específicamente" significa que un agente de unión o un anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de lo anterior al epítipo, proteína, o molécula objetivo que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. En ciertas divulgaciones del presente documento, "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D por lo menos aproximadamente de 1 mM o menos, pero más usualmente menor que aproximadamente 1 μ M. En ciertas divulgaciones del presente documento, "se une específicamente" significa que un anticuerpo se une a un objetivo a veces con una K_d de por lo menos
- 40 aproximadamente de 0,1 μ M o menos, en otras veces por lo menos aproximadamente 0,01 μ M o menos, y en otras veces por lo menos aproximadamente 1 nM o menos. Debido a que la identidad de secuencia entre las proteínas homologas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína en más de una especie (por ejemplo, VEGF humano y VEGF de ratón). Del mismo modo, debido a la homología dentro de ciertas regiones de las secuencias de polipéptidos de diferentes proteínas, la unión específica puede incluir un anticuerpo (u otro polipéptido o agente de unión) que reconoce más de una proteína (por ejemplo, VEGF-A humana y VEGF-B humana). Se entiende que, en ciertas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo o porción de unión que une específicamente un primer objetivo puede o no unirse específicamente a un segundo objetivo. Como tal "unión específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva, unión a un objetivo individual. De esta manera, un anticuerpo puede, en ciertas divulgaciones del presente documento, unirse
- 50 específicamente a más de un objetivo. En ciertas divulgaciones del presente documento, múltiples objetivos se pueden unir por el mismo sitio de unión a antígeno en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede, en ciertos casos, comprender dos sitios de unión a antígenos idénticos, cada uno de los cuales se une específicamente al mismo epítipo en dos o más proteínas. En ciertas divulgaciones del presente documento alternativas, un anticuerpo puede ser multispecifico y comprende por lo menos dos sitios de unión a antígeno con especificidades diferentes. A manera de ejemplo no limitante, un anticuerpo biespecifico puede comprender un sitio de unión a antígeno que reconoce un epítipo en una proteína (por ejemplo, VEGF humanos) y comprende además un segundo sitio de unión a antígeno diferente que reconoce un epítipo diferente en una segunda proteína (por ejemplo, DLL4 humano). Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión específica.
- 60 Los términos "polipéptido" y "péptido" y "proteínas" se usan intercambiamente en la presente y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender
- 65

- aminoácidos modificados, y se puede interrumpir por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de unión a disulfuro, glicosilación, lapidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende, que debido a que los polipéptidos de esta invención se pueden basar en anticuerpos, en ciertas divulgaciones del presente documento, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas individuales o cadenas asociadas.
- 5
- 10 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan intercambiamente en la presente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa.
- 15 "Condiciones de alta severidad" se pueden identificar por aquellos que: (1) emplean resistencia iónica baja y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 15 mM/citrato de sodio 1,5 mM/0,1 % de dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplear durante la hibridación en un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, 50 % (v/v) de formamida con 0,1 % de albumina de suero bovino/ 0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM pH 6.5 en 5x SSC (NaCl 0,75M, citrato de sodio 75 mM) a 42°C; o (3)
- 20 emplear durante la hibridación 50 % de formamida en 5x SSC, fosfato de sodio 50mM (pH 6.8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, 5x de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón pasado por ondas sonoras (50 µg/ml), 0,1 % de SDS, y 10 % de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C a 0,2x de SSC y 50 % formamida, seguido por un lavado de alta severidad que consiste de 0,1x de SSC que contiene EDTA a 55°C.
- 25 Los términos "idéntico" o porcentaje "de identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácido que son los mismos, cuando se comparan y se alinean (espacios de introducción, si es necesario) para correspondencia máxima, no considerando ninguna sustitución de aminoácido conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir usando software
- 30 o algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual. Varios algoritmos y software que se pueden usar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácido o nucleótidos son bien conocidos en el campo. Estos incluyen, pero no se limitan a, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, y variaciones de los mismos. En algunas divulgaciones del presente documento, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la divulgación son sustancialmente idénticos, significan que tienen por lo menos 70 %, por lo menos 75 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, y en algunas divulgaciones del presente documento por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de residuos de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, como es debido usando un algoritmo de comparación de secuencia o por inspección visual. En algunas divulgaciones del presente documento, la identidad existe sobre una región de las secuencias que es por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40-60 residuos,
- 35 por lo menos aproximadamente 60-80 residuos en longitud o cualquier valor integral entre los mismos. En algunas divulgaciones del presente documento, la identidad existe sobre una región más larga que 60-80 residuos, tal como por lo menos aproximadamente 80-100 residuos, en algunas divulgaciones del presente documento las secuencias son sustancialmente idénticas sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, tal como la región de codificación de una secuencia de nucleótidos.
- 40
- 45 Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la cual un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuo de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en el campo, incluyendo cadenas laterales básicas, (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. De maneja preferible, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la invención no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno al cual se unen el polipéptido o anticuerpos. Los métodos para identificar las sustituciones conservadoras de nucleótidos o aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en el campo.
- 50
- 55
- 60 El término "vector" como se usa en la presente significa un constructo, que es capaz de suministrar, y usualmente expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula hospedera. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmido, cósmido, o vectores fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.
- 65 Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que se "aisla" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Polipéptidos

aislados, polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células, o composiciones incluyen aquellas que se han purificado a un grado que ya no están en una forma en la cual se encuentran en la naturaleza. En algunas divulgaciones del presente documento, un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o composición que se aísla es sustancialmente pura.

5 El término "sustancialmente puro" como se usa en la presente se refiere a un material que es por lo menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), por lo menos 90 % puro, por lo menos 95 % puro, por lo menos 98 % puro, o por lo menos 99 % puro.

10 Los términos "cáncer" y "canceroso" como se usa en la presente se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos en los cuales una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma, sarcoma, y cánceres hematológicos tales como linfoma y leucemia.

15 Los términos "tumor" y "neoplasma" como se usa en la presente se refiere a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento celular excesivo o proliferación, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones precancerosas.

20 Los términos "metástasis" como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual un cáncer se propaga o transfiere desde el sitio de origen hasta otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en una nueva ubicación. Una célula "metastásica" o "metastásizante" es una que pierde los contactos adhesivos con células vecina y migra a través del torrente sanguíneo por nudos linfáticos desde el sitio primario de la enfermedad para invadir las estructuras corporales vecinas.

25 Los términos "célula madre cancerosa" y "CSC" y "célula madre tumoral" y "célula iniciadora de tumor" se usan intercambiamente en la presente y se refieren a células de un cáncer o tumor que: (1) tienen capacidad proliferativa extensiva; (2) son capaces de división células asimétrica para generar uno o más tipos de progenie de células diferenciadas en donde las células diferenciadas tienen potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones de células simétricas para auto renovación o auto mantenimiento. Estas propiedades confieren para las células madre cancerosas la capacidad de formar o establecer un tumor o cáncer en trasplante en serie en un hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, un ratón) comparada con la mayoría de las células tumorales que no logran formar tumores. Las células madre cancerosas se someten al auto renovación versus diferenciación en una manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar a través del tiempo conforme se presentan las mutaciones.

35 Los términos "célula cancerosa" y "célula tumoral" se refiere a la población total de células derivadas de un cáncer o tumor o lesión precancerosa, incluyendo ambas células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células cancerosas, y células madre tumorigénicas (células madre cancerosas) . Como se usa en la presente, los términos "célula cancerosa" o "célula tumoral" se modificarán por el término "no tumorigénicos" cuando se refiere solamente a esas células que carecen de la capacidad de renovación y diferenciarse para distinguir esas células tumorales de las células madre cancerosas.

40 El término "tumorigénico" como se usa en la presente se refiere a las características funcionales de una célula madre cancerosa incluyendo las propiedades de auto renovación (que da origen a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales) y proliferación para generar otras células tumorales (que da origen a células tumorales diferenciadas y de esta manera no tumorigénicas).

45 El término "tumorigenicidad" como se usa en la presente se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células del tumor para formar tumores palpables en el trasplante en serie en los hospederos inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones). Esta definición también incluye poblaciones enriquecidas y/o aisladas de células madre cancerosas que forman tumores palpables en el trasplante en serie en hospederos inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones).

50 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores, y similares, que van a ser el recipiente de un tratamiento particular. Normalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan intercambiamente en la presente en referencia a un sujeto humano.

55 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un producto o compuesto aprobado (o aprobable) por una agencia reguladora del gobierno Federal o gobierno estatal o listado en la Farmacopea de E.U.A u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, incluyendo humanos.

60 Los términos "excipiente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéutico aceptable" se refiere a un excipiente, portador o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con por lo menos un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente descripción, y que no destruye la actividad del agente de unión. El excipiente, portador o adyuvante no deben ser tóxicos cuando se administran con un agente de unión en dosis

suficientes para administrar un efecto terapéutico.

Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" o "efecto terapéutico" se refieren a una cantidad de un agente de unión, un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) tiene un efecto terapéutico y como tal puede reducir el número de células cancerosas; disminuir la tumorigenicidad, frecuencia tumorigénica o capacidad tumorigénica; reduce el número de frecuencia de células madre cancerosas; reduce el tamaño del tumor; reduce la población de células cancerosas; inhibe y/o detiene la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo, por ejemplo, la propagación de cáncer en el tejido blando y huesos; inhibe y/o detiene la metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibe y/o detiene el crecimiento de células tumorales o cancerosas; alivia a un grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reduce la morbilidad y mortalidad; mejora la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. En la medida en que el agente, por ejemplo, un anticuerpo, prevenga el crecimiento y/o extermine células cancerosas existentes, se puede referir como citostático y/o citotóxico.

Los términos "que trata" o "tratamiento" o "trata" o "que alivia" o "alivia" se refiere a tanto 1) mediciones terapéuticas que curan, desaceleran, reducen los síntomas de y/o detienen la progresión de una condición o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previene o desaceleran el desarrollo de una condición o trastorno patológico objetivo. De esta manera aquellas personas sin necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos a quienes el trastorno se va a prevenir. En algunas divulgaciones del presente documento, un sujeto es exitosamente "tratado" de acuerdo con los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o una ausencia de infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos incluyendo la propagación de células cancerosas en el tejido blando y huesos; inhibición de o una ausencia de metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibición o una ausencia del crecimiento canceroso; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas; mejora en la calidad de vida; reducción en la tumorigenicidad; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas; o alguna combinación de los efectos.

Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen formas plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

Se entiende que donde las divulgaciones del presente documento se describan en la presente con el lenguaje "que comprende" de otra manera las divulgaciones del presente documento análogas descritas en los términos de "que consiste de" y/ "que consiste esencialmente de" también se proporcionan. También se entiende que donde las divulgaciones del presente documento se describan en la presente con el lenguaje "que consiste esencialmente de" de otra manera las divulgaciones del presente documento análogas descritas en los términos de "que consiste de" también se proporcionan.

El término "y/o" como se usa en la frase tal como "A y/o B" en la presente se propone incluir tanto A y B; A o B; A (sola); y B (sola). Del mismo modo el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B, y/o C" se propone para abarcar cada una de las siguientes divulgaciones del presente documento: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (sola); B (sola); y C (sola).

II. Anticuerpos

La presente divulgación proporciona agentes que se unen específicamente a las proteínas VEGF humanas y/o proteínas DLL4 humano. Estos agentes se refieren en la presente como "agentes de unión a VEGF/DLL4". La frase "agente de unión a VEGF/DLL4" abarca a agentes que se unen solamente de VEGF, agentes que se unen solamente de DLL4, y agentes bispecíficos que se unen tanto a VEGF como DLL4. En ciertas divulgaciones del presente documento, además de unirse específicamente a VEGF y/o DLL4, los agentes de unión a VEGF/DLL4 se unen específicamente además a por lo menos un objetivo o antígeno adicional. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un polipéptido. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une específicamente a VEGF humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une específicamente a DLL4 humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo bispecífico que se une específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. Las secuencias de aminoácidos (aa) de longitud completa para el VEGF humano (VEGF-A) y DLL4 humano son conocidas en la técnica y se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 27 (VEGF) y SEQ ID NO:23 (DLL4).

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une a VEGF y/o DLL4 con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 μ M o menor, aproximadamente 100 nM o menor, aproximadamente 40 nM o menor, aproximadamente 20 nM o menor, aproximadamente 10 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se unen a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente

20 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 10 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une a VEGF y/o DLL4 con una K_D de aproximadamente 0,1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a tanto VEGF humano como VEGF de ratón con una K_D de aproximadamente 100 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une tanto a VEGF humano como VEGF de ratón con una K_D de aproximadamente 50 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se une a tanto DLL4 humano como DLL4 de ratón con una K_d de aproximadamente 100 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se une tanto a DLL4 humano como a DLL4 de ratón con una K_D de aproximadamente 50 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, la constante de disociación del agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) a VEGF es la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión VEGF que comprende por lo menos una porción del VEGF inmovilizado sobre un chip Biacore. En algunas divulgaciones del presente documento, la constante de disociación del agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) a DLL4 es la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión DLL4 que comprende por lo menos una porción de DLL4 inmovilizado sobre un chip Biacore.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une tanto a VEGF como a DLL4 con una K_D de aproximadamente 100 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une tanto a VEGF como a DLL4 con una K_d de aproximadamente 50 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une tanto a VEGF como a DLL4 con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une tanto a VEGF como a DLL4 con una K_d de aproximadamente 10 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se une tanto a VEGF como a DLL4 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad de uno de los sitios de unión del antígeno puede ser más débil que la afinidad del otro sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, la K_D de un sitio de unión a antígeno puede ser de aproximadamente 1 nM y la K_d del segundo sitio de unión a antígeno puede ser de aproximadamente 10 nM. En algunas divulgaciones del presente documento, la diferencia en la afinidad entre los dos sitios de unión a antígeno puede ser de aproximadamente 2 veces o más, de aproximadamente 3 veces o más, de aproximadamente 5 veces o más, de aproximadamente 8 veces o más, de aproximadamente 10 veces o más, de aproximadamente 15 veces o más, de aproximadamente 20 veces o más, de aproximadamente 30 veces o más, de aproximadamente 50 veces o más, o de aproximadamente 100 veces o más. La modulación de las afinidades de los sitios de unión a antígeno puede afectar la actividad biológica del anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, la disminución de la afinidad del sitio de unión a antígeno para DLL4 o VEGF, puede tener un efecto deseable, por ejemplo, toxicidad disminuida del agente de unión o índice terapéutico incrementado.

A manera de ejemplo no limitante, el anticuerpo biespecífico puede comprender (a) un primer sitio de unión a antígeno que se une a VEGF humano con una K_D entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 1,0 nM, (b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano con una K_D entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 20 nM, entre aproximadamente 0,5 nM y aproximadamente 20 nM, entre aproximadamente 1,0 nM y 10 nM. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas ligeras idénticas.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une a VEGF y/o DLL4 con una concentración efectiva máxima media (EC_{50}) de aproximadamente 1 μ M o menor, de aproximadamente 100 nM o menor, de aproximadamente 40 nM o menor, de aproximadamente 20 nM o menor, de aproximadamente 10 nM o menor, de aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es monovalente, monoespecífico, bivalente, o multiespecífico. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se conjuga a una porción citotóxica. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se aísla. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es sustancialmente puro.

Los agentes de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpos) de la presente invención se pueden someter a ensayo par unión específica por cualquier método conocido en el campo. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como análisis Biacore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis Western blot, radioinmunoensayo, ELISA, 5 inmunoensayo de "emparedado", ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, y ensayo de fijación de complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente, ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogéneo (HTRF, por sus siglas en inglés), e inmunoensayo de proteína A. Tales ensayos son de rutina y bien conocidos en el campo (véase, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, Editores, 1994-present, *Current Protocols in Molecular Biology*, John 10 Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

Por ejemplo, la unión específica de un anticuerpo a VEGF humano y/o DLL4 humano se puede determinar usando el ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtítulo de 96 pocillos con antígeno, agregar el anticuerpo u otro agente de unión conjugado a un compuesto detectable tal como un 15 sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un período de tiempo, y detectar la presencia del agente de unión unido al antígeno. En algunas divulgaciones del presente documento el agente de unión o anticuerpo no se conjuga a un compuesto detectable, sino en cambio un segundo anticuerpo que reconoce el agente de unión o anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-Fc) y se conjuga a un compuesto detectable se agrega al pocillo. En algunas divulgaciones del presente documento, en lugar de recubrir 20 el pocillo con el antígeno, el agente de unión o anticuerpo se puede recubrir al pocillo y un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable se puede agregar después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Una persona de experiencia en el campo estaría bien informada en cuanto los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada, así como otras variaciones de los ELISAs conocidos en la técnica.

En otro ejemplo, la unión específica de un anticuerpo a VEGF humano y/o DLL4 humano se puede determinar usando el FACS. Un ensayo de clasificación FACS puede comprender generar un constructo de ADNc que exprese un antígeno como una proteína de fusión, transfecte el constructo en las células, exprese el antígeno sobre la superficie 25 de las células, mezcle el agente de unión o anticuerpo con las células transfectadas, e incuba durante un periodo de tiempo. Las células unidas por el agente de unión o anticuerpo se pueden identificar al usar un anticuerpo secundario conjugado a un compuesto detectable. (Por ejemplo, anticuerpo anti-Fc conjugado con PE) y un citómetro de flujo. Una persona de experiencia en el campo estaría bien informada en cuanto a los parámetros que se pueden modificar para optimizar la señal detectada, así como otras variaciones de FACS que pueden mejorar la clasificación (por 30 ejemplo, clasificación para bloquear los anticuerpos).

La afinidad de unión de un anticuerpo u otro agente de unión a un antígeno (por ejemplo, VEGF o DLL4) y la constante de disociación de una interacción de anticuerpo- antígeno se puede determinar por ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno 35 etiquetado (por ejemplo, H o I), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades de incremento del antígeno no etiquetado seguido por la detección del anticuerpo unido al antígeno etiquetado. La afinidad del anticuerpo para el antígeno y las constantes de disociación de unión se puede determinar a partir de los datos por y el análisis gráfico de Scatchard. En algunas divulgaciones del presente documento, el análisis cinético Biacore se usa para determinar la constante de asociación y disociación de la unión de los anticuerpos o agentes que se unen a un antígeno (por ejemplo, VEGF o DLL4). El análisis cinético Biacore comprende analizar la 40 unión y la disociación de los anticuerpos de los chips con el antígeno inmovilizado (por ejemplo, VEGF o DLL4) sobre su superficie.

En ciertas divulgaciones del presente documento, la invención proporciona un agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente al VEGF humano, en donde el agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs del anticuerpo 219R45 (véase la Tabla 1). 50 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una o más de las CDRs de 219R45, dos o más de las CDRs de 219R45, tres o más de las CDRs de 219R45, cuatro o más de las CDRs de 219R45, cinco o más de las CDRs de 219R45, o seis de las CDRs de 219R45. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une a VEGF humano y VEGF de ratón.

Tabla 1

	219R45
5	HC CDR1 NYWMH (SEQ ID NO:17)
	HC CDR2 DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)
	HC CDR3 HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)
10	LC CDR1 RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)
	LC CDR2 AASNQGS (SEQ ID NO:21)
	LC CDR3 QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

15 La divulgación también proporciona un agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente al VEGF humano, en donde el agente de unión a VEGF comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

30 La divulgación también proporciona un agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a VEGF humano, en donde el agente de unión a VEGF comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas divulgaciones del presente documento, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

45 La divulgación también proporciona un agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente VEGF, en donde el agente de unión a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:49, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo de unión a VEGF u otro agente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:7, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8.

65 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une a VEGF con una K_D de aproximadamente 10 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se

5 une a VEGF con una K_D de aproximadamente 1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une a VEGF con una K_D de aproximadamente 0,1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une a VEGF con una K_D de aproximadamente 0,01 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del agente de unión a VEGF se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del agente de unión a VEGF para VEGF se altera. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del agente de unión a VEGF se incrementa. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del agente de unión a VEGF se disminuye. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une a VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une a VEGF humano y VEGF de ratón.

10 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 219R45. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 219R45 (con o sin la secuencia líder). En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF es el anticuerpo 219R45.

15 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF comprende, consiste esencialmente de, o consiste del anticuerpo 219R45.

20 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en VEGF como un anticuerpo de la divulgación. En otra modalidad, un agente de unión a VEGF es un anticuerpo que se une a un epítipo en VEGF que se traslapa con el epítipo en el VEGF unido por un anticuerpo de la divulgación. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en VEGF como el anticuerpo 219R45. En otra divulgación del presente documento, el agente de unión a VEGF es un anticuerpo que se une a un epítipo en VEGF que se traslapa con el epítipo en el VEGF unido por el anticuerpo 219R45.

25 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF inhibe la unión de VEGF a por lo menos un receptor VEGF. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF inhibe la unión de VEGF humano a VEGFR-1 o VEGFR-2. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une específicamente VEGF y modula la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une específicamente VEGF e inhibe la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF se une específicamente VEGF e inhibe el crecimiento tumoral.

30 En ciertas divulgaciones del presente documento, la invención proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente al DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis de las CDRs del anticuerpo 21R79 (véase la Tabla 2). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R79, dos o más de las CDRs 21R79, tres o más de las CDRs 21R79, cuatro o más de las CDRs 21R79, cinco o más de las CDRs 21R79, o seis de las CDRs 21R79. La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis de las CDRs del anticuerpo (véase la Tabla 2). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R75, dos o más de las CDRs 21R75, tres o más de las CDRs 21R75, cuatro o más de las 21R75, cinco o más de las CDRs 21R75, o seis de las CDRs 21R75. La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente al DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDRs del anticuerpo 21R83 (véase la Tabla 2). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una o más de las CDRs 21R83, dos o más de las CDRs 21R83, tres o más de las CDRs 21R83, cuatro o más de las CDRs 21R83, cinco o más de las CDRs 21R83, o seis de las CDRs de 21R83. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a DLL4 humano y DLL4 de ratón.

Tabla 2

	21R7 9	21R75	21R83
5	HC CDR1	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)
	HC CDR2	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)
10	HC CDR3	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)	RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16)
	LC CDR1	RAS ESVDNY GISFMK (SEQ ID NO:20)	RAS ESVDNY GISFMK (SEQ ID NO:20)
15	LC CDR2	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)
20	LC CDR3	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

En ciertas divulgaciones del presente documento, la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo de unión a DLL4 es una HC CDR1 mínima que comprende AYYIH (SEQ ID NO:79).

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión es un anticuerpo que se une al DLL4 humano y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO: 79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), en donde X₁ es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina, o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

La invención también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

La invención también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas divulgaciones del presente documento, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

La invención también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4, en donde el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10. En ciertas divulgaciones

del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

5 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:48, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo de unión a DLL4 u otro agente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:6, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

30 La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas divulgaciones del presente documento, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4, en donde el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:58, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:56, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8.

La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ

ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el agente de unión a DLL4 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (d) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; (e) una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido; y (f) una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22), o una variante de la misma que comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácido. En ciertas divulgaciones del presente documento, las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras.

La divulgación también proporciona un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a DLL4, en donde el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:64, y una región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:62, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente es un anticuerpo biespecífico.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:5, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a DLL4 con una K_D de 25 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a DLL4 con una K_d de 10 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a DLL4 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a DLL4 con una K_D de aproximadamente 0,1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a DLL4 con una K_D de aproximadamente 0,01 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del agente de unión a DLL4 se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad de agente de unión a DLL4 para DLL4 se altera. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del agente de unión a DLL4 se incrementa. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del agente de unión a DLL4 se disminuye.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R79 (con o sin la secuencia líder). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 es el anticuerpo 21R79.

En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R79.

5 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R75 (con o sin la secuencia líder). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 es el anticuerpo 21R75.

En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R75.

10 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 21R83. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 21R83 (con o sin la secuencia líder). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 es el anticuerpo 21R83.

15 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 comprende, que consiste esencialmente de, o consiste de, el anticuerpo 21R83.

20 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 se une a un fragmento N-terminal de DLL4 humano (aminoácidos 1191 de SEQ ID NO: 24) . En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 40-47 de SEQ ID NO:25 y los aminoácidos 113-120 d SEQ ID NO:25.

25 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 as un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de unión a DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por un anticuerpo de la divulgación. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como el anticuerpo 21R79. En otra modalidad, el agente de unión a DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por el anticuerpo 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como un anticuerpo 21R75. En otra modalidad, el agente de unión a DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por el anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como el anticuerpo 21R83. En otra modalidad, el agente de unión a DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por el anticuerpo 21R83.

40 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 inhibe la unión de DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En ciertas divulgaciones del presente documento, el receptor Notch es Notch1, Notch2, Notch3, o Notch4. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une específicamente DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une específicamente DLL4 e inhibe la señalización Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une específicamente DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une específicamente DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une específicamente DLL4 e inhibe la tumorigenicidad. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a DLL4 se une específicamente DLL4 y reduce el número de frecuencia de CSCs en un tumor.

50 La divulgación también proporciona un agente de unión a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente al VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un objetivo asociado al tumor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una CDR2 de cadena pesada

que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RAS E SVDNYGIS FMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

5 En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a
10 SEQ ID NO: 12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente
15 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

La divulgación también un agente de unión a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo biespecífico. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un objetivo asociado a tumor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 80), en donde X₂ es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina, o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina, o ácido aspártico y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 59) , o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además: una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende: un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 59) , o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16), y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 58, o SEQ ID NO: 64. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además una región variable de cadena ligera que tiene

por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64; y/o una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

La divulgación también proporciona un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) que se une específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19); en donde el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13) o AYYIH (SEQ ID NO:79), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:80), en donde X₁ es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina, o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R79.

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21M18.

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH

(SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R75.

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico es 219R45-MB-21R83.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11; una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 58, o SEQ ID NO: 64; y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 97 %, o por lo menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones

del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO: 9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico comprende una primera región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que consiste esencialmente de SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que consiste esencialmente de SEQ ID NO:12.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21M18. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R79. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R75. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R83. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R79 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21M18 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R75 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF 219R45, una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-DLL4 21R83 y dos regiones variables de cadena ligera idénticas.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio CH3 y un segundo dominio CH3, cada uno de los cuales se modifica para promover la formación de heteromultímeros. En algunas divulgaciones del presente documento, el primero y segundo dominios CH3 se modifican usando una técnica de perillas en agujeros. En algunas divulgaciones del presente documento, el primero y segundo dominios CH3 comprenden cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones electrostáticas alteradas. En algunas divulgaciones del presente documento, el primero y segundo dominios CH3 comprenden cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas alteradas.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende regiones constantes de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de: (a) una primera región constante IgG1 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 253 y 292 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG1 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 240 y 282 se sustituyen con lisina; (b) una primera región constante IgG2 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 249 y 288 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 236 y 278 se sustituyen con lisina; (c) una primera región constante IgG3 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 300 y 339 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG3 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 287 y 329 se sustituyen con lisina; y (d) una primera región constante IgG4 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones 250 y 289 se sustituyen con glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG4 humana en donde los aminoácidos en las posiciones 237 y 279 se sustituyen con lisina.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG1 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 253 y 292, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG1 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 240 y 282, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas divulgaciones del presente

- documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG3 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 300 y 339, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 287 y 329, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG4 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 250 y 289, en donde los aminoácidos son glutamato o aspartato, y una segunda región constante IgG4 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 237 y 279, en donde los aminoácidos son lisina.
- En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son glutamato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 249 y 288, en donde los aminoácidos son aspartato, y una segunda región constante IgG2 humana con sustituciones de aminoácido en las posiciones 236 y 278, en donde los aminoácidos son lisina.
- En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:5. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:56. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:62. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende además una cadena ligera de SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 7, una cadena pesada de SEQ ID NO:5, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO: 8. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:6, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO: 56, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO: 8. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:7, una cadena pesada de SEQ ID NO:62, y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:8.
- En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF con una K_D de aproximadamente 50 nM o menor, aproximadamente 25 nM o menor, aproximadamente 10 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50 nM o menor, aproximadamente 25 nM o menor, aproximadamente 10 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF con una K_D de aproximadamente 50 nM o menor y se une a DLL4 con una K_D de aproximadamente 50 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF con una K_D de aproximadamente 25 nM o menor y se une a DLL4 con una K_D de aproximadamente 25 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF con una K_d de aproximadamente 10 nM o menor y se une a DLL4 con una K_d de aproximadamente 10 nM o menor. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF con una K_d de aproximadamente 1 nM o menor y se une a DLL4 con una K_d de aproximadamente 1 nM o menor.
- En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno con una afinidad de unión que es más débil que la afinidad de unión del segundo sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, en algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico puede unirse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 0,1 nM a 1 nM y puede unirse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 1 nM a 10 nM. O el anticuerpo biespecífico puede unirse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 1 nM a 10 nM y puede unirse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 0,1 nM a 1 nM. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico puede unirse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 0,1 nM a 1 nM y puede unirse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 1 nM a 10 nM. O el anticuerpo biespecífico puede unirse a DLL4 con una K_D que varía de aproximadamente 1 nM a 10 nM y puede unirse a VEGF con una K_D que varía de aproximadamente 0,1 nM a 1 nM en algunas divulgaciones del presente documento, la diferencia en la afinidad entre los dos sitios de unión a antígeno puede ser de aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 15 veces o más, aproximadamente 30 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, o aproximadamente 100 veces o más. En algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del sitio de unión a antígeno para VEGF se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del sitio de

- unión a antígeno se altera. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del sitio de unión a VEGF se incrementa. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del sitio de unión a VEGF se disminuye. En algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos residuo de aminoácido en por lo menos una CDR del sitio de unión a antígeno para DLL4 se sustituye con un aminoácido diferente de modo que la afinidad del sitio de unión a DLL4 se altera. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del sitio de unión a DLL4 se incrementa. En algunas divulgaciones del presente documento, la afinidad del sitio de unión a DLL4 se disminuye. En algunas divulgaciones del presente documento, las afinidades de los sitios de unión a antígeno de tanto el VEGF como DLL4 se alteran.
- 10 La divulgación proporciona polipéptidos, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos, que se unen específicamente a VEGF y/o DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, un polipéptido se une a VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un polipéptido se une a DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un polipéptido se une a VEGF humano y VEGF de ratón. En algunas divulgaciones del presente documento, un polipéptido se une a DLL4 humano y DLL4 de ratón.
- 15 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49.
- 20 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.
- 25 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64.
- 30 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.
- 35 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.
- 40 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, y SEQ ID NO:49. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión VEGF/DLL4 comprende además un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:12.
- 45 En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) compete para la unión específica a VEGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 compete con un anticuerpo 219R45 para la unión específica a VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo compete para la unión específica a VEGF en un ensayo de unión específica competitiva. En algunas divulgaciones del presente documento, el VEGF es VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el VEGF es VEGF de ratón.
- 50 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF- DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en VEGF as un anticuerpo de la invención. En otra modalidad, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en VEGF que se traslapa por el epítipo en VEGF unido por un anticuerpo de la invención. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en VEGF como un anticuerpo 219R45. En otra modalidad, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en VEGF que se traslapa por el epítipo en VEGF unido por anticuerpo 219R45.
- 55 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compete para la
- 60
- 65

unión específica a VEGF con el anticuerpo 219R45 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo).

5 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) compite para la unión específica a DLL4 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:58, o SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:12. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4
10 competes con un anticuerpo 21R79 para la unión específica a DLL4 humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R75 para la unión específica a DLL4 humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 competes con un anticuerpo 21R83 para la unión específica a DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo compite para la unión específica a DLL4 en un ensayo de unión específica competitiva. En algunas divulgaciones del presente documento, el DLL4 es DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el DLL4 es DLL4 de ratón.

15 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como un anticuerpo de la invención. En otra divulgación, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por un anticuerpo de la divulgación. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como anticuerpo
20 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se une al mismo epítipo, o esencialmente al mismo epítipo, en DLL4 como anticuerpo 21R83. En otra modalidad, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por anticuerpo 21R79. En otra divulgación, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por anticuerpo 21R75. En otra divulgación, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 que se traslapa por el epítipo en DLL4 unido por anticuerpo 21R83.

30 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a DLL4 con el anticuerpo 21R79 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a DLL4 con el anticuerpo 21R75 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a DLL4 con el anticuerpo 21R83 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a DLL4 con el anticuerpo 21M18 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo).

40 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M79 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M75 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente que compite para la unión específica a VEGF y/o DLL4 con el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M83 (por ejemplo, en un ensayo de unión competitivo).

50 En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente se une a VEGF y modula la actividad de VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe la actividad de VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF y modula la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista VEGF e inhibe el crecimiento tumoral.

55 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) descrito en la presente se une a DLL4 humano y modula la actividad de DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la actividad de Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe la señalización Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 y modula la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 y promueve la angiogénesis aberrante. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista DLL4 e inhibe el crecimiento tumoral.

ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de unión a antígeno 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de unión a antígeno 21R83. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la señalización Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la unión de VEGF a por lo menos un receptor. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 inhibe la unión de VEGF a VEGFR-1 o VEGFR-2. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 inhibe la unión de VEGF a por lo menos un receptor VEGF por lo menos aproximadamente 10 %, por lo menos aproximadamente 25 %, por lo menos aproximadamente 50 %, por lo menos aproximadamente 75 %, por lo menos aproximadamente 90 %, o por lo menos aproximadamente 95 %. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es un anticuerpo 219R45. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de unión a antígeno 219R45. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45- MB-21M18. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45- MB-21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45- MB-21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de VEGF humano a por lo menos un receptor VEGF es el anticuerpo biespecífico 219R45- MB-21R83.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la unión de la proteína DLL4 a por lo menos un receptor Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 inhibe la unión de DLL4 a Notch1, Notch2, Notch3, y/o Notch4. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 inhibe la unión de DLL4 a por lo menos un receptor Notch por lo menos aproximadamente 10 %, por lo menos aproximadamente 25 %, por lo menos aproximadamente 50 %, por lo menos aproximadamente 75 %, por lo menos aproximadamente 90 %, o por lo menos aproximadamente 95 %. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo 21R83. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de unión a antígeno 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de unión a antígeno 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es un anticuerpo biespecífico que comprende el sitio de unión a antígeno 21R83. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que inhibe la unión de DLL4 humano a por lo menos un receptor Notch es el anticuerpo biespecífico 219R45- MB-21R83.

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de unión a VEGF/DLL4 (o agente de unión a VEGF/DLL4 candidato) inhibe el VEGF o afecta la angiogénesis son conocidos en el campo. Los ensayos *in vitro* de angiogénesis incluyen pero no se limitan a, ensayos de proliferación de HUVEC, ensayos de formación de tubo de células endoteliales, ensayos de proliferación (o formación de brotes), ensayos de migración de células HUVEC, y ensayos de invasión. En algunas divulgaciones del presente documento, las células en la presencia de VEGF y la presencia de un agente de unión a VEGF/DLL4 se comparan a las células en presencia de VEGF sin el agente de unión a VEGF/DLL4 presente, y se evalúan para efectos en la angiogénesis (o efectos biológicos asociados con la angiogénesis). Los ensayos *in vivo* de la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, ensayos de enchufe matrigel, ensayos de microcavidades corneales, y ensayos de membrana corioalantóica de pollo (CAM, por sus siglas en inglés).

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de unión a VEGF/DLL4 (o agente de unión a VEGF/DLL4 candidato) inhibe la activación o señalización Notch son conocidos en el campo. Por ejemplo, los ensayos reporteros de luciferasa, basados en células que usan un vector reportero TCF/Luc que comprende múltiples copias del dominio de unión a TCF de cadena arriba de un gen reportero de luciferasa de luciérnaga se pueden usar para medir los niveles de señalización Notch *in vitro* (Gazit y colaboradores, 1999, *Oncogene*, 18; 5959-66; TOPflash, Millipore, Billerica MA). En algunas divulgaciones del presente documento, un ensayo reportero de luciferasa, basado en células que usa un vector reportero a CBF/Luc que contiene múltiples copias del dominio de unión a CBF de cadena arriba de los genes reporteros de luciferasa de luciérnaga se pueden usar. El nivel de la señalización Notch en presencia de uno o más ligandos Notch (por ejemplo, DLL4 expresado sobre la superficie de células transfectadas o proteína de fusión DLL4-Fc soluble) y en presencia de un agente de unión a VEGF/DLL4 se compara con el nivel de la señalización Notch sin el agente de unión a VEGF/DLL4 presente.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células tumorales, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, desencadenar la muerte celular de células tumorales, prevenir la metástasis de células tumorales, disminuir la supervivencia de las células tumorales, modular la angiogénesis, inhibir la angiogénesis, inhibir la angiogénesis productora, o promover la angiogénesis aberrante.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* (por ejemplo, en un modelo de ratón de xenoinjerto, y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas divulgaciones del presente documento, el crecimiento tumoral se inhibe por lo menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces como es comparado con un tumor no tratado.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de reducir la tumorigenicidad de un tumor. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, tal como un modelo de xenoinjerto de ratón. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor al disminuir el número o frecuencia de células madre cancerosas en el tumor. En ciertas divulgaciones del presente documento, el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se reduce por lo menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces. En ciertas divulgaciones del presente documento, la reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas se determina al limitar el ensayo de dilución usando un modelo animal. Ejemplos adicionales y guía con respecto al uso para limitar los ensayos de dilución para determinar una reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se puede encontrar, por ejemplo, en el Número de Publicación Internacional WO 2008/042236; Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0064049; y Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0178305.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de modular la angiogénesis. En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de modular la angiogénesis *in vivo* (por ejemplo, en un modelo de ratón de xenoinjerto, y/o en un humano que tiene cáncer). En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir la angiogénesis. En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de promover la angiogénesis aberrante. En ciertas divulgaciones del presente documento, Los agentes de unión a VEGF/DLL4 son capaces de inhibir la angiogénesis y/o promover la angiogénesis aberrante, conduciendo a vascularización no productiva.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 descrito en la presente tiene una vida media circulante en ratones, monos cynomolgus, o humanos de por lo menos aproximadamente 2 horas, por lo menos aproximadamente 5 horas, por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 3 días, por lo menos aproximadamente 1 semana, o por lo menos aproximadamente 2 semanas. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG2) que tiene una vida media circulante en ratones, monos cynomolgus, o humanos de por lo menos aproximadamente 2 horas, por lo menos aproximadamente 5 horas, por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 3 días, por lo menos aproximadamente 1 semana, o por lo menos aproximadamente 2 semanas. Los métodos para incrementar (o disminuir) la vida media de agentes tales como polipéptidos y anticuerpos son conocidos en el campo. Por ejemplo, los métodos conocidos para incrementar la vida media circulante de los anticuerpos IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc que incrementa la unión dependiente de pH del anticuerpo al receptor Fc neonatal (FcRn) en pH 6.0 (véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente de E.U.A. Nos. 2005/0276799, 2007/0148164, y 2007/0122403). Métodos conocidos para incrementar la vida media circulante de fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc incluyen tales técnicas como PEGilación.

En algunas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son anticuerpos. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos policlonales se producen al inmunizar un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, cabra, burro) con un antígeno de interés (por ejemplo, un fragmento de péptido purificado, proteína recombinante de longitud completa, o proteína de fusión por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El antígeno se puede conjugar opcionalmente a un portador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) o albúmina de suero. El antígeno (con o sin una proteína portadora) se diluye en solución salina estéril y se combina usualmente con un adyuvante (por ejemplo, Adyuvante de Freund Completo o Incompleto) para formar una emulsión estable. Después de un breve de tiempo suficiente, los anticuerpos policlonales se recubren del animal inmunizado, usualmente de sangre o ascitis. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar de suero o ascitis de acuerdo con los métodos estándares en el campo incluyendo, pero no limitado a, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio de iones, electroforesis en gel y diálisis.

En algunas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma conocidos por una persona de experiencia en el campo (véase por ejemplo, Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497). En algunas divulgaciones del presente documento, el uso del método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal hospedero apropiado, se inmuniza como se describe en lo anterior para inducir de los linfocitos la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de inmunización. En algunas divulgaciones del presente documento, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. En algunas divulgaciones del presente documento, el antígeno de inmunización puede ser una proteína humana o una porción de la misma. En algunas divulgaciones del presente documento, el antígeno de inmunización puede ser una proteína de ratón o una porción de la misma.

Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea de células de mieloma adecuadas, usando, por ejemplo, polietilenglicol. Las células de hibridoma se seleccionan usando medios especializados como son conocidos en el campo y los linfocitos no fusionados y las células de mieloma no sobreviven al proceso de selección. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos contra específicamente un antígeno elegido se puede identificar por varios métodos incluyendo, pero no limitado a, inmunoprecipitación, inmunotinción, y ensayos de unión *in vitro* (por ejemplo, citometría de flujo, FACS, ELISA, y radioinmunoensayo). Los hibridomas se pueden propagar ya sea en cultivo *in vitro* usando métodos estándares (J.W. Goding, 1996, *Anticuerpos monoclonales: Principies and Practice*, 3ª Edición, Academic Press, San Diego, CA) o *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar del medio de cultivo o fluido ascítico de acuerdo con los métodos estándares en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, y diálisis.

En ciertas divulgaciones del presente documento, anticuerpos monoclonales se pueden elaborar usando técnicas de ADN recombinantes como es conocido por una persona experta en el campo. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tales como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y su secuencia se determina usando técnicas estándares. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras luego se clonan en vectores de expresión adecuados que producen los anticuerpos monoclonales cuando se transfectan en células hospederas tales como E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), o células de mieloma que de otra manera no producen proteínas de inmunoglobulina.

En ciertas otras divulgaciones del presente documento, los anticuerpos monoclonales recombinantes, o fragmentos de los mismos, se pueden aislar de bibliotecas de expresión en fago que expresan dominios variables o CDRs de una especie deseada (véase por ejemplo, McCafferty y colaboradores, 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson y colaboradores, 1991, *Nature*, 352:624- 628; y Marks y colaboradores, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581- 597).

El polinucleótido(s) que codifica un anticuerpo monoclonal se puede modificar, por ejemplo, al usar tecnología de ADN recombinante para genera anticuerpos alternativos. En algunas divulgaciones del presente documento, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, se pueden sustituir para esas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico, o para un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas divulgaciones del presente documento, las regiones constantes se truncan o remueven para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable se puede usar para utilizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo monoclonal contra VEGF y/o DLL4 es un anticuerpo humanizado. normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las CDRs se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tienen la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de unión usando métodos conocidos por una persona experta en el campo. En algunas divulgaciones del presente documento, los residuos de región de estructura Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad de unión. En algunas

- divulgaciones del presente documento, un anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad del anticuerpo, afinidad y/o capacidad. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos una, y normalmente dos tres, regiones de dominio variables que contienen todas o sustancialmente todas, de las CDRs que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, de las regiones de estructuras son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. En ciertas divulgaciones del presente documento, tales anticuerpos humanizados se usan terapéuticamente debido a que pueden reducir la antigenicidad y respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administra a un sujeto humano. Una persona experta en el campo sería capaz de obtener un anticuerpo humanizado funcional con inmunogenicidad reducida siguiendo las técnicas conocidas (véase por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,225, 539; 5, 585, 089; 5, 693,761; y 5, 693,762).
- En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar directamente usando varias técnicas conocidas en el campo. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos humanos se pueden generar de linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o de linfocitos aislados de un individuo inmunizado. En cualquier caso, las células que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo se pueden generar y aislar (véase, por ejemplo, Cole y colaboradores, 1985, *Anticuerpos monoclonales and Cáncer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer y colaboradores, 1991, *J. Immunol.*, 147:86-95; y Patentes de E.U.A. Nos. 5,750,373; 5,567,610; y 5,229,275). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca en fago, donde la biblioteca en fago expresa anticuerpos humanos (Vaughan y colaboradores, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y colaboradores, 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks y colaboradores, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Alternativamente, la tecnología de expresión en fago se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variables de inmunoglobulina de donadores inmunizados. Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas en fago de anticuerpos también se describen en las Patentes de E.U.A. Nos. 5, 969, 108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6, 555, 313; 6,582,915; 6, 593, 081; 6, 300, 064; 6, 653, 068; 6, 706, 484; y 7,264,963; y Rothe y colaboradores, 2008, *J. Mol. Bio.*, 376:1182-1200. Una vez que los anticuerpos se identifican, las estrategias de maduración por afinidad conocidas en el campo incluyendo pero no limitado a, transposición de cadena (Marks y colaboradores, 1992, *Biotechnology*, 10:779-783) y mutagénesis dirigida al sitio, se pueden emplear para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.
- En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos humanos se pueden hacer en ratones transgénicos que contienen sitios de inmunoglobulina humana. En la inmunización estos ratones son capaces de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este procedimiento se describe en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5, 625, 126; 5,633,425; y 5,661,016.
- La presente divulgación también abarca anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son capaces de reconocer y unir específicamente por lo menos dos antígenos o epítomos diferentes. Los epítomos diferentes pueden estar ya sea dentro de la misma molécula (por ejemplo, dos epítomos en una sola proteína) o en diferentes moléculas (por ejemplo, un epítomo en una proteína y un epítomo en una segunda proteína). En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico tiene potencia mejorada como es comparado con un anticuerpo individual o una combinación de más de un anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico tiene toxicidad reducida como es comparado con un anticuerpo individual o a una combinación de más de un anticuerpo. Es conocido por aquellas personas de experiencia en el campo que cualquier agente de unión (por ejemplo, anticuerpo) puede tener farmacocinética única (PK) (por ejemplo, línea media circulante). En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de sincronizar la PK de dos agentes de unión activos en donde los dos agentes de unión individuales tienen diferentes perfiles de PK. En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de concentrar las acciones de dos agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) en un área común (por ejemplo, un tumor y/o entorno de tumor). En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de concentrar las acciones de dos agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) a un objetivo común (por ejemplo, un tumor o una célula tumoral). En algunas divulgaciones del presente documento, un anticuerpo biespecífico tienen la capacidad de fijar como objetivo las acciones de dos agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) a más de una ruta o función biológica.
- En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a VEGF y un segundo objetivo. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a DLL4 y un segundo objetivo. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a VEGF y DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a VEGF humano y DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano monoclonal o humano humanizado. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico inhibe la angiogénesis y reduce el número o frecuencia de células madre

cancerosas. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos e inhibe la maduración de vasos sanguíneos. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico previene la hiperproliferación endotelial. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico tiene toxicidad disminuida y/o efectos secundarios. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico tiene toxicidad disminuida y/o efectos secundarios como es comparado con una mezcla de los dos anticuerpos individuales o los anticuerpos como agentes individuales. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico tiene un índice terapéutico incrementado. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico tiene un índice terapéutico incrementado como es comparado con una mezcla de los dos anticuerpos individuales o los anticuerpos como agentes individuales.

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico puede reconocer específicamente y unirse a un primer objetivo de antígeno, (por ejemplo, DLL4) así como un segundo objetivo de antígeno, tal como una molécula efectora en un leucocito (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7) o un receptor Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celulares a la célula que expresa el primer objetivo de antígeno. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para dirigir los agentes de citotoxicidad a las células que expresan un antígeno objetivo particular. Estos anticuerpos poseen un sitio de unión a antígeno (por ejemplo, a DLL4 humano) y un segundo sitio que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionucleidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA.

Las técnicas para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidas por aquellas personas expertas en el campo, véase por ejemplo, Millstein y colaboradores, 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan y colaboradores, 1985, *Science*, 229:81; Suresh y colaboradores, 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Trauneker y colaboradores, 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659; Shalaby y colaboradores, 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny y colaboradores, 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553; Gruber y colaboradores, 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; Patente de E.U.A. No. 5,731,168; Publicación Internacional No. WO 2009/089004; y Publicación de Patente de E.U.A. No. 2011/0123532. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos biespecíficos comprenden regiones constantes de cadena pesada o modificaciones en los aminoácidos que son parte de la interfase entre las dos cadenas pesadas. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar usando una estrategia de "perillas en agujeros" (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 5,731,168; Ridgway y colaboradores, 1996, *Prof. Engin.*, 9:617-621). Algunas veces la terminología de "perillas" y "agujeros" se reemplaza con los términos "protuberancias" y "cavidades". En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos biespecíficos pueden comprender regiones bisagra variantes incapaces de formar uniones de disulfuro entre las cadenas pesadas (véase, por ejemplo, WO 2006/028936). En algunas divulgaciones del presente documento, las modificaciones pueden comprender cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones electrostáticas alteradas. En algunas divulgaciones del presente documento, las modificaciones pueden comprender cambios en los aminoácidos que dan por resultado interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas alteradas.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmento de anticuerpo que comprende sitios de unión a antígeno. Los anticuerpos con más de dos valencias también se contemplan. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar (Tutt y colaboradores, 1991, *J. Immunol.*, 147:60). De esta manera, en ciertas divulgaciones del presente documento los anticuerpos a VEGF y/o DLL4 son multiespecíficos.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos (u otros polipéptidos) descritos en la presente pueden ser mono-específicos. En ciertas divulgaciones del presente documento, cada uno del uno o más sitios de unión a antígeno que un anticuerpo contiene es capaz de unirse (o unirse) a un epítipo homólogo en diferentes proteínas.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden tener diferentes funciones o capacidades que los anticuerpos intactos; por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden tener penetración incrementada del tumor. Varias técnicas son conocidas para la producción de los fragmentos de anticuerpo incluyendo, pero no limitado a, digestión proteolítica de anticuerpos intactos. En algunas divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento F(ab')₂ producido por la digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')₂. En otras divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor. En ciertas divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo se producen recombinantemente. En algunas divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo incluyen Fv o fragmentos de Fv de cadena individual (scFv). Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, y scFv se pueden expresar en y secretar de *E. coli* u otras células hospederas, permitiendo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. En algunas divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo se aíslan de las bibliotecas de fago de anticuerpos como se plantea en la presente. Por ejemplo, los métodos se pueden usar para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Use y colaboradores, 1989, *Science*, 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para VEGF y/o DLL4 o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. En algunas divulgaciones del presente documento, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de anticuerpo lineales. En ciertas divulgaciones del presente documento, los fragmentos

de anticuerpo son monoespecíficos o biespecíficos. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un scFv. Se pueden usar varias técnicas para la producción de anticuerpos de cadena individual específicos a VEGF o DLL4 (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4.946.778).

5 Además puede ser deseable, especialmente en el caso de los fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo a fin de alterar (por ejemplo, incrementar o disminuir) su vida media en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o al incorporar el epítipo en una etiqueta de péptido que luego se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte intermedia (por ejemplo, por síntesis de ADN o péptidos).

10 Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para fijar como objetivo células inmunes a células no deseadas (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4.676.980). También se contempla que los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteína sintética, incluyendo aquellas que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o al formar una unión de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptoputirimidato.

20 Para los propósitos de la presente divulgación, se debe apreciar que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con el objetivo (es decir, VEGF humano o DLL4 humano). En este aspecto, la región variable puede comprender o ser derivado de cualquier tipo de mamífero que se pueda inducir a totalizar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o de origen de conejo. En algunas divulgaciones del presente documento, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras divulgaciones del presente documento, las regiones variables de los anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente no humana) se pueden diseñar o adaptar específicamente para mejorar las propiedades de unión o para reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este aspecto, las regiones variables útiles en la presente invención se pueden humanizar o alterar de otra manera a través de la inclusión de secuencias de aminoácido importadas.

35 En ciertas divulgaciones del presente documento, los dominios variables en tanto las cadenas pesadas como ligeras se alteran por el reemplazo o por lo menos parcial de una o más CDRs y, si es necesario, por el reemplazo de la región de estructura parcial y la modificación y/o alteración de secuencia. Aunque las CDRs se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o aún subclase como el anticuerpo del cual las regiones de estructura se derivan, se prevé que las CDRs se pueden derivar de un anticuerpo de diferente clase y frecuentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDRs con todas las CDRs de una región variable donadora para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede ser solo necesario transferir esos residuos que son requeridos para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno.

40 Las alteraciones a la región variable no obstante, aquellos expertos en el campo apreciarán que los anticuerpos modificados de esta divulgación comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunoreactivos de los mismos) en los cuales por lo menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han detectado o de otra manera alterado para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como localización incrementada de tumor o vida media de suero incrementada cuando se compara con anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante relativa o inalterada. En algunas divulgaciones del presente documento, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatible con esta divulgación comprenden adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Los anticuerpos modificados dados a conocer en la presente pueden contener alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En algunas divulgaciones del presente documento, uno o más dominios se suprimen parcial o completamente de las regiones constantes de los anticuerpos modificados. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos modificados comprenderán constructos o variantes suprimidos de dominio en donde el dominio CH2 completo se ha removido (constructos ACH2). En algunas divulgaciones del presente documento, el dominio de región constante omitido se reemplazó por un espaciador de aminoácido corto (por ejemplo, residuos de 10 aminoácidos) que proporcionan algo de la flexibilidad molecular impartida normalmente por la región constante ausente.

60 En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos modificados se diseñan para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra del anticuerpo. En otras divulgaciones del presente documento, un espaciador de péptido se inserta entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, los constructos se pueden expresar en donde el dominio CH2 se ha suprimido y el dominio CH3 (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Tal espaciador se puede agregar para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, cabe destacar que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, probar ser inmunogénicos e inducen una respuesta inmune indeseada contra el constructo. Por consiguiente, en ciertas

divulgaciones del presente documento, cualquier espaciador agregado al constructo será relativamente no inmunogénico para mantener las calidades biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

5 En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos modificados pueden tener solamente una supresión parcial de un dominio o sustitución constante de pocos o aún un aminoácido individual. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en las áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc e incrementar en consecuencia la localización de la célula cancerosa y/o penetración del tumor. Similarmente, puede ser deseable simplemente suprimir la parte de uno o más dominios de región constante que controlan una función efectora específica (por ejemplo unión de C1q de complemento) que se modula. Tales supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) mientras que dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante sujeto. Por otra parte, como se alude en o anterior, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados y dados a conocer se pueden modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil del consultor resultante. En este aspecto puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión a Fc) mientras que mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos modificados comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables tal como disminuir o incrementar la función efectora y proporcionar más sitios de unión de citotoxina o carbohidratos.

10 Es conocido en el campo que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a la región Fc de los anticuerpos IgG o IgM (unidos al antígeno) activa el sistema complementario. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también activa la respuesta inflamatoria y también se puede aplicar en la hipersensibilidad autoinmune. Además, la región Fc de un anticuerpo puede unirse a una respuesta que expresa un receptor Fc (FcR). Existe varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo el agobio y destrucción de las partículas recubiertas con anticuerpo, eliminación de los complejos inmunes, lisis de las células objetivo recubiertas con anticuerpo por células exterminadoras (llamado citotoxicidad de células dependientes de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina.

15 En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos modificados proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, en algunas divulgaciones del presente documento, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de esta manera la localización de células cancerosas y/o penetración del tumor. En otras divulgaciones del presente documento, las modificaciones de la región constante incrementan la vida media en suero del anticuerpo. En otras divulgaciones del presente documento, las modificaciones de región constante reducen la vida media en suero del anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, la región constante se modifica para eliminar las uniones de disulfuro o porciones de oligosacáridos. Las modificaciones a la región constante de acuerdo con esta divulgación se pueden hacer fácilmente usando técnicas de ingeniería bioquímica molecular bien conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo.

20 En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 que es un anticuerpo no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo no tiene actividad de ADCC, y/o ninguna actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo no se une a un receptor Fc, y/o factores de complemento. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo no tiene una función efectora.

25 La presente divulgación abarca además variantes equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, expuestos en la presente. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustituciones conservadoras, es decir la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se propone para una sustitución de aminoácido conservadora es bien conocido en el campo y se describe en la presente.

30 De esta manera, la presente divulgación proporciona métodos para producir un anticuerpo que se une a VEGF y/o DLL4, incluyendo anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a tanto VEGF como DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el método para producir un anticuerpo que se une a VEGF y/o DLL4 comprende el uso de técnicas de hibridoma. En algunas divulgaciones del presente documento, el método para generar un anticuerpo que se une a VEGF o DLL4 o un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF y DLL4 comprende la clasificación de una biblioteca en fago humana. La presente invención proporciona además métodos para identificar

un anticuerpo que se une a VEGF y/o DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para unirse a VEGF o una porción del mismo. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para unirse a DLL4 o una porción del mismo. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación de FACS para unirse tanto a VEGF como a DLL4 o una porción de los mismos. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando ELISA para la unión a VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando el ELISA para la unión a DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación usando el ELISA para unirse a VEGF y DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para el bloqueo de la unión de VEGF humano a un receptor VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación FACS para el bloqueo de la unión de DLL4 humano a un receptor Notch humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la inhibición o bloqueo de la señalización Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la inhibición o bloqueo de la actividad de VEGF (por ejemplo, inducción de proliferación de HUVEC). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se identifica por la clasificación para la modulación del angiogénesis.

En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo VEGF humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende los aminoácidos 27-232 de VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo a VEGF humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el método comprende además aislar los anticuerpos o células productoras de anticuerpos del mamífero. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF comprende: inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano, y aislar las células productoras de anticuerpos del mamífero inmunizado. En algunas divulgaciones del presente documento, el método comprende además fusionar las células productoras de anticuerpos con células de una línea de células de mieloma para formar células de hibridoma. En algunas divulgaciones del presente documento, el método el método comprende además seleccionar una célula de hibridoma que expresa un anticuerpo que se une al VEGF. En ciertas divulgaciones del presente documento, el mamífero es un ratón. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se selecciona usando un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano.

En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo al DLL4 humano comprende inmunizar un mamífero con una polipéptido que comprende los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo al DLL4 humano comprende inmunizar un mamífero con un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une a DLL4 comprende: inmunizar un mamífero con una polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano, y aislar las células productoras del anticuerpo del mamífero inmunizado. En algunas divulgaciones del presente documento, el método comprende además fusionar las células productoras de anticuerpos con células de una línea de células de mieloma para formar células de hibridoma. En algunas divulgaciones del presente documento, el método comprende además seleccionar una célula de hibridoma que expresa un anticuerpo que se une a DLL4. En ciertas divulgaciones del presente documento, el mamífero es un ratón. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo se selecciona usando un polipéptido que comprende por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano.

En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo a VEGF humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos que se unen a VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo DLL4 humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos que se unen al DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para generar un anticuerpo al VEGF humano y/o al DLL4 humano comprende clasificar una biblioteca de expresión de anticuerpos para anticuerpos biespecíficos que se unen al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, la biblioteca de expresión de anticuerpos es una biblioteca de fagos. En algunas divulgaciones del presente documento, la clasificación comprende inmunoplaqueo. En algunas divulgaciones del presente documento, la biblioteca de expresión de anticuerpos (por ejemplo, una biblioteca de fagos) se clasifica usando por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos identificados en la primera clasificación se clasifican contra el uso de por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano para identificar un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF y DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, la biblioteca de expresión de anticuerpos (por ejemplo, una biblioteca de fagos) se clasifica usando por lo menos una porción de los aminoácidos 27-529 del DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos identificados en la primera clasificación se clasifican contra el uso de por lo menos una porción de los aminoácidos 27-232 del VEGF humano para identificar un anticuerpo biespecífico que une a VEGF y DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo identificado en las clasificaciones es un antagonista VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo identificado en la clasificación inhibe las actividades biológicas inducidas por VEGF.

En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo identificado en la clasificación es un antagonista DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo identificado en la clasificación inhibe la señalización Notch inducida por DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo identificado en la clasificación se une tanto al VEGF humano como el VEGF de ratón. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo identificado en la clasificación se une a tanto el DLL4 humano como el DLL4 de ratón.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos descritos en la presente se aíslan. En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos descritos en la presente son sustancialmente puros.

En algunas divulgaciones del presente documento de la presente invención, los agentes de unión a VEGF/DLL4 son polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se unen a VEGF y/o DLL4. Se reconocerá en el campo que algunas secuencias de aminoácidos de los agentes de unión descritos en la presente se pueden variar sin efecto significativo en la estructura o función de la proteína. De esta manera, la invención incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra el VEGF humano y/o DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, las variaciones de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de unión a VEGF/DLL4 incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y/u otros tipos de sustituciones.

En algunas divulgaciones del presente documento, los polipéptidos descritos en la presente se aíslan. En algunas divulgaciones del presente documento, los polipéptidos descritos en la presente son sustancialmente puros.

Los polipéptidos, análogos y variantes de los mismos, se pueden modificar adicionalmente para contener porciones químicas adicionales no normalmente parte del polipéptido. Las porciones derivadas pueden mejorar o de otra manera modular la solubilidad, la vida media biológica, y/o absorción del polipéptido. Las porciones también pueden reducir o eliminar los efectos secundarios indeseables de los polipéptidos y variantes. Un estudio general para las porciones químicas se puede encontrar en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición*, 2005, University of the Sciences, Filadelfia, PA.

El polipéptido descrito en la presente se puede producir mediante cualquier método adecuado conocido en el campo. Tales métodos varían de métodos de síntesis de proteínas directos para construir una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos y que expresa esa secuencia en un hospedero adecuado. En algunas divulgaciones del presente documento, una secuencia de ADN se construye usando tecnología recombinante al aislar o al sintetizar una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véase, por ejemplo, Zoeller y colaboradores, 1984, *PNAS*, 81:5662-5066 y Patente de E.U.A. No. 4,588,585.

En algunas divulgaciones del presente documento, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se puede construir por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se pueden diseñar basados en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y al seleccionar esos codones que son favorecidos en la célula hospedera en la cual el polipéptido recombinante de interés se producirá. Métodos estándares se pueden aplicar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos completa se puede usar para construir un gen de nuevo traducido. Además, un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular se puede sintetizar. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones de polipéptido deseado se pueden sintetizar y luego unir. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente terminales 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio, u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido particular de interés se pueden insertar en un vector de expresión y unir operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para expresión de la proteína en un hospedero deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar por la secuenciación de nucleótidos, mapeo de enzimas de restricción, y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedero adecuado. Como se conoce bien en el campo, a fin de obtener niveles de expresión alta de un gen transfectado en un hospedero, el gen se debe unir operativamente a la secuencia de control de expresión transcripcionales y/o traduccionales que son funcionales en el hospedero de expresión elegido.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los vectores de expresión recombinantes se usan para amplificar y expresar los anticuerpos que codifican ADN, o fragmentos de los mismos, contra el VEGF y/o DLL4 humanos. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes pueden ser constructos de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN derivados de ADNc sintéticos que codifican una cadena de polipéptidos de un agente de unión a VEGF/DLL4, tal como un anticuerpo anti-VEGF o un anticuerpo anti-DLL4, o un fragmento del mismo, unidos operativamente a un elemento reguladores transcripcionales y/o traduccionales adecuados derivados de genes de mamífero, microbiano, virales, o de insecto. Una unidad transcripcional comprende generalmente un ensamblaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o de codificación que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína,

y (3) secuencias de inicio y terminación de transcripción y traducción apropiadas. Los elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad de replications en un hospedero, usualmente conferido por un origen de replicación, y un gene de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están "operativamente unidas" cuando se relacionan funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido de señal (líder secretor) se une operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor el cual participa en la secreción del polipéptido; un promotor se une operativamente a una secuencia de codificación si controla una transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se une operativamente a una secuencia de codificación y se coloca para permitir la traducción. En algunas divulgaciones del presente documento, los elementos estructurales propuestos para el uso en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedera. En otras divulgaciones del presente documento, en situaciones donde la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo se puede escindir de manera opcional subsecuentemente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de una secuencia de control de expresión y un vector de expresión depende de la elección del hospedero. Una prevariedad de combinaciones de hospedero/vector de expresión se pueden emplear. Los vectores de expresión útiles para los hospederos eucarióticos incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospederos bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli* incluyendo pCR1, pBR322, pMB9, y sus derivados, y plásmidos de intervalo de hospedero más amplios, tal como M13 y otros fagos de ADN de hebra individual filamentosos.

Los agentes de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, polipéptidos) de la presente divulgación se pueden expresar de uno o más vectores. Por ejemplo, en algunas divulgaciones del presente documento, un polipéptido de cadena pesada se expresa por un vector, un segundo polipéptido de cadena pesada se expresa por un segundo vector y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un tercer vector. En algunas divulgaciones del presente documento, un primer polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un vector y un segundo polipéptido de cadena pesada se expresa por un segundo vector. En algunas divulgaciones del presente documento, los polipéptidos de cadena pesada se expresan por un vector y un polipéptido de cadena ligera se expresa por un segundo vector. En algunas divulgaciones del presente documento, tres polipéptidos se expresan de un vector. De esta manera, en algunas divulgaciones del presente documento, un primer polipéptido de cadena pesada, un segundo polipéptido de cadena pesada, y un polipéptido de cadena ligera se expresan por un vector individual.

Células hospederas adecuadas para la expresión de un polipéptido o anticuerpo de unión a VEGF/DLL4 (o una proteína de VEGF o DLL4 para el uso como un antígeno) incluyen procariotas, células de levadura, células de insecto, o células eucarióticas superiores bajo el control de los promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o *Bacillus*. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas de células establecidas de origen de mamífero como se describe a continuación. Los sistemas de traducción sin células también se emplean. Los vectores de clonación y expresión apropiados para el uso con hospederos celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen en Pouwels y colaboradores, 1985, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, NY. La información adicional con respecto a los métodos de producción de proteínas, incluyendo producción de anticuerpos, se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente de E.U.A. No. 2008/0187954; Patentes de E.U.A. Nos. 6.413.746; 6.660.501; Publicación de Patente Internacional No. WO 04/009823.

Varios sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto se pueden usar para expresar polipéptidos recombinantes. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede ser deseable debido a que estas proteínas esta generalmente de manera correcta plegadas, apropiadamente modificadas y biológicamente funcionales. Ejemplos de líneas de células hospederas de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, líneas de células COS-7 (derivadas de reunión de monos), L-929 (derivadas de fibroblastos de murino), C127 (derivadas de tumor mamario de murino) 3T3 (derivadas de fibroblasto de murino), CHO (derivadas de ovario de hámster Chino), HeLa (derivadas de cáncer cervical humanos), BHK (derivadas de fibroblasto de riñón de hámster), HEK-293 (derivadas de riñón embrionario humano) y variantes de estas líneas de células. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen que se expresa, y otra secuencia no transcrita de flanqueo 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitio de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores de empalme y aceptores, y secuencia de terminación transcripcionales. La expresión de proteína recombinante en baculovirus también ofrece un método sólido para producir proteínas correctamente plegadas y biológicamente funcionales. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son bien conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo (véase, por ejemplo, Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

De esta manera, la presente divulgación proporciona células que comprenden los agentes de unión a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En algunas divulgaciones del presente documento, las células producen los agentes de unión a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, las células producen un agente de unión a VEGF, tal

como un anticuerpo anti-VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, las células producen un agente de unión a DLL4, tal como un anticuerpo anti-DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que se une a DLL4. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un agente de unión a VEGF/DLL4 biespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF y DLL4. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo 219R45. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo 21R83. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 219R45. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R83. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21M18. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 219R45 y un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R83. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R75. En ciertas divulgaciones del presente documento, las células producen el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R83.

Las proteínas producidas por un hospedero transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Los métodos estándares incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tal como hexa-histidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de recubrimiento de influenza, y glutationa-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir la fácil purificación por el pasaje sobre una columna de afinidad apropiada. La cromatografía de afinidad usada para la purificar inmunoglobulinas puede incluir cromatografía de Proteína A, Proteína G y Proteína L. las proteínas aisladas se pueden caracterizar físicamente usando tales técnicas como proteólisis, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), enfoque isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés), y cristalografía de rayos X. La pureza de las proteínas aisladas se puede determinar usando técnicas conocidas por aquellas personas de experiencia en el campo, incluyendo pero no limitado a, SDS-PAGE, SEC, electroforesis en gel capilar, IEF, y enfoque isoeléctrico capilar (cIEF).

En algunas divulgaciones del presente documento, los sobrenadantes del sistema de expresión que secretan proteína recombinante en los medios de cultivo primero se pueden concentrar usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultra filtración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el material concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. En algunas divulgaciones del presente documento, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo pendientes (DEAE). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. En algunas divulgaciones del presente documento, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. En algunas divulgaciones del presente documento, se puede emplear un medio de hidroxapatita, incluyendo pero no limitado a, hidroxapatita de cerámica (CHT). En ciertas divulgaciones del presente documento, una o más etapas de HPLC de fase inversa que emplea un medio RP-HPLC hidrofóbico, por ejemplo, gel de sílice que tienen grupos metilo pendientes u otros alifáticos, se pueden emplear para purificar adicionalmente una proteína recombinante (por ejemplo, un agente de unión a VEGF/DLL4). Algo o todo de las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, se pueden emplear para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

En algunas divulgaciones del presente documento, las proteínas heterodiméricas tales como anticuerpos biespecíficos se purifican de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. En algunas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se aíslan y/o purifican usando por los menos una etapa de cromatografía. En algunas divulgaciones del presente documento, la por lo menos una etapa de cromatografía comprende cromatografía de afinidad. En algunas divulgaciones del presente documento, la por lo menos una etapa de cromatografía comprende además cromatografía de intercambio aniónico. En algunas divulgaciones del presente documento, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende por lo menos 90 % de anticuerpo heterodimérico. En algunas divulgaciones del presente documento, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de anticuerpo heterodimérico. En algunas divulgaciones del

presente documento, el producto de anticuerpo aislado y/o purificado comprende aproximadamente 100 % de anticuerpo heterodimérico.

En algunas divulgaciones del presente documento, la proteína recombinante producida en el cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, por extracción inicial de pelotillas de células, seguido por una o más de etapas de cromatografía de concentración, de salación, de intercambio de iónico a acuoso, o exclusión de tamaño. La HPLC se puede emplear para etapas de purificación final. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden alterar por cualquier método conveniente, incluyendo ciclado de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisado celular.

Los métodos conocidos en el campo para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en las Publicación de Patentes de E.U.A. Nos. 2008/0312425; 2008/0177048; y 2009/0187005.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un polipéptido que no tiene un anticuerpo. Varios métodos para identificar y producir polipéptidos no de anticuerpos que se unen con alta afinidad a un objetivo de proteínas son objetivos en el campo. Véase, por ejemplo, Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse y colaboradores, 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill y colaboradores, 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76; y Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83. En ciertas divulgaciones del presente documento, la tecnología de expresión en fago o células de mamífero se pueden usar para producir e/o identificar un polipéptido de unión a VEGF/DLL4 que no es un anticuerpo. En ciertas divulgaciones del presente documento, el polipéptido comprende un andamio de proteínas de un tipo seleccionado del grupo que consiste de proteína A, proteína G, una lipocalina, un dominio de fibronectina, y un dominio de repetición consenso de anquirina, y tioredoxina.

En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes o anticuerpos de unión a VEGF/DLL4 se pueden usar en cualquiera de varias formas conjugadas (es decir, un inmunoc conjugado o radioconjugado) o no conjugadas. En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos se pueden usar en una forma no conjugada para aprovechar los mecanismos de defensa naturales del sujeto incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento y toxicidad celular dependiente de anticuerpo para eliminar células malignas o cancerosas.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo o polipéptido) se conjuga a un agente citotóxico. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico que incluye, pero no se limita a, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercaladores. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente citotóxico es una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina de difteria, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Pitolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente citotóxico es un radioisótopo para producir radioconjugado o anticuerpo radio conjugado. Varios radionúclidos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjugados incluyendo, pero no limitado a, ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{131}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re and ^{212}Bi . Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como caliqueamicinas, maitansinoides, tricotecenos, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se pueden usar. Los conjugados de un anticuerpo y agentes citotóxicos se pueden hacer usando varios agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales, incluyendo, pero no limitado a, propionato de N-succinimidil-3-(2-pirididil) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutareldérido), compuestos bis-azido (tal como hexanodiamina de bis(p-azidobenzoilo), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6- diisocianato), compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5- difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

III. Polinucleótidos

La divulgación abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido (o un fragmento de un polipéptido) que une específicamente a VEGF, DLL4, tanto VEGF como DLL4. El término "polinucleótidos que codifican un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye solamente secuencia de codificación para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias de codificación y/o no de codificación adicionales. Por ejemplo, en algunas divulgaciones del presente documento, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo al VEGF humano codifica un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que comprende el sitio de unión a antígeno).

La divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo DLL4 humano o codifica un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que comprende el sitio de unión a antígeno). Los polinucleótidos de la invención pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético; y puede ser de doble hebra o hebra individual, y si es de hebra

individual puede ser la hebra de codificación o hebra no de codificación (anti-sentido)

5 En ciertas divulgaciones del presente documento, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, y SEQ ID NO:64. En ciertas divulgaciones del presente documento, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:62, y SEQ ID NO: 64. En algunas divulgaciones del presente documento, el polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78.

20 En ciertas divulgaciones del presente documento, el polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80 % idéntica, por lo menos aproximadamente 85 % idéntica, por lo menos aproximadamente 90 % idéntica, por lo menos aproximadamente 95 % idéntica, y en algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. En ciertas divulgaciones del presente documento, el polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80 % idéntica, por lo menos aproximadamente 85 % idéntica, por lo menos aproximadamente 90 % idéntica, por lo menos aproximadamente 95 % idéntica, y en algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que se hibrida a SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, y SEQ ID NO:78. En ciertas divulgaciones del presente documento, la hibridación está bajo condiciones de alta severidad.

45 En ciertas divulgaciones del presente documento, los polinucleótidos comprenden la secuencia de codificación para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedera (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido de la células). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una proteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedera para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proteína que es la proteína madura más los residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde permanece una proteína activa madura.

50 En ciertas divulgaciones del presente documento, los polinucleótidos comprenden la secuencia de codificación para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedero bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de hemaglutinina de influenza cuando un hospedero mamífero (por ejemplo, células COS-7) se usa. En algunas divulgaciones del presente documento, la secuencia marcadora es una etiqueta FLAG, un péptido de la secuencia DYKDDDDK (SEQ ID NO:45) que se puede usar en conjunción con otras etiquetas de afinidad.

60 La presente divulgación se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos, y/o derivados.

65 En ciertas divulgaciones del presente documento, la presente invención proporciona polinucleótidos que comprende polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos por lo menos aproximadamente 80 % idéntica, por lo menos aproximadamente 85 % idéntica, por lo menos aproximadamente 90 % idéntica, por lo menos aproximadamente 95 % idéntica, y en algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99

% idénticas a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), o fragmento del mismo, descrito en la presente.

5 Como se usa en la presente, la frase un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia se propone para referirse a esa secuencia de nucleótidos de polinucleótidos que es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos de por lo menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales y en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones 5' o 3' terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

15 Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones de codificación, regiones no de codificación, o ambas. En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido contiene alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones, o supresiones, pero no altera las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido comprende sustituciones silenciosas que da por resultado ningún cambio a la secuencia de aminoácidos del polipéptido (debido a la degeneración del código genético). Las variantes de polinucleótido se pueden producir por varias razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un hospedero particular (es decir, cambiar los codones en el ARNm humano a aquellos preferidos por un hospedero bacteriano tal como E. coli). En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido comprende por lo menos una mutación silenciosa en una región no de codificación o de codificación de la secuencia.

20 En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido se produce para modular o alterar la expresión (o niveles de expresión) del polipéptido codificado. En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido se produce para incrementar la expresión del polipéptido codificado. En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido se produce para disminuir la expresión de polipéptido codificado. En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido tiene expresión incrementada del polipéptido codificado como es comparado con una secuencia de polinucleótido parenteral. En algunas divulgaciones del presente documento, una variante de polinucleótido tiene expresión disminuida del polipéptido codificado como es comparado con una secuencia de polinucleótido parenteral.

35 En algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos una variante de polinucleótido se produce (sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado) para incrementar la producción de una molécula heteromultimérica. En algunas divulgaciones del presente documento, por lo menos una variante de polinucleótido se produce (sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado) para incrementar la producción de un anticuerpo biespecífico.

40 En ciertas divulgaciones del presente documento, los polinucleótidos se aíslan. En ciertas divulgaciones del presente documento, los polinucleótidos son sustancialmente puros.

45 Los vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en la presente también se proporcionan. En algunas divulgaciones del presente documento, un vector de expresión comprende una molécula de polinucleótidos. En algunas divulgaciones del presente documento, una célula hospedera comprende un vector de expresión que comprende la molécula de polinucleótido. En algunas divulgaciones del presente documento, una célula hospedera comprende una molécula de polinucleótido.

50 IV. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

Los agentes de unión (incluyendo polipéptidos y anticuerpos) de la divulgación que se unen (por ejemplo, se unen específicamente) a VEGF y/o DLL4 son útiles en varias aplicaciones incluyendo, pero no limitado a, métodos de tratamiento terapéuticos, tales como el tratamiento de cáncer. En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes son útiles para inhibir la actividad de VEGF, inhibir la señalización Notch inducida por DLL4, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el volumen de tumor, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un tumor, modular la angiogénesis, y/o inhibir la angiogénesis. Los métodos de uso pueden ser *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista de VEGF humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista de DLL4 humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 es un antagonista de tanto VEGF como DLL4.

65 En ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 se usan en el tratamiento de una enfermedad asociada con la angiogénesis, es decir angiogénesis incrementada y/o angiogénesis aberrante. En ciertas divulgaciones del presente documento, la enfermedad es una enfermedad dependiente de la angiogénesis. En

ciertas divulgaciones del presente documento, los agentes de unión a VEGF/DLL4 se usan en el tratamiento de trastornos caracterizados por niveles incrementados de células madre y/o células progenitoras.

5 La presente divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor usando los agentes de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpos descritos en la presente. En ciertas divulgaciones del presente documento, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende poner en contacto una célula tumoral con un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, una línea de células inmortalizadas o una línea de células cancerosas se cultivan en el medio al cual se agrega un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-DLL4, o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas divulgaciones del presente documento, las células tumorales se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra de sangre y se cultiva en el medio al cual se agrega un agente de unión a VEGF/DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales.

15 En algunas divulgaciones del presente documento, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende poner en contacto un tumor o células tumorales con un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpo) *in vivo*. En ciertas divulgaciones del presente documento, poner en contacto un tumor o célula tumoral con un agente de unión a VEGF/DLL4 se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-DLL4, o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 se puede administrar a un animal hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que tienen un xenoinjerto de tumor. En algunas divulgaciones del presente documento, las células tumorales y/o células madre cancerosas se aíslan de una muestra de paciente tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra de sangre y se inyecta en un animal hospedero inmunocomprometido (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que luego se les administra un agente de unión a VEGF/DLL4 para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de las células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento tumoral ("modelo preventivo"). En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se administra como un producto terapéutico después de que el tumor se ha desarrollado a un tamaño especificado ("modelo terapéutico"). En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al VEGF humano y DLL4 humano.

30 En ciertas divulgaciones del presente documento, el método para inhibir el crecimiento de un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión a VEGF/DLL4. En ciertas divulgaciones del presente documento, el sujeto es un humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor que se removió. En ciertas divulgaciones del presente documento, el tumor comprende células madre cancerosas. En ciertas divulgaciones del presente documento, la frecuencia de células madre cancerosas en el tumor se reduce por la administración del agente de unión a VEGF/DLL4. La invención también proporciona un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4). En algunas divulgaciones del presente documento, un método para reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en un sujeto, comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión a VEGF/DLL4.

45 En algunas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor sólido. En ciertas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste de tumor colorectal, tumor de colon, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor cervical, tumor de la vejiga, glioblastoma, y tumor de cabeza y cuello. En ciertas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor colorectal o un tumor de colon. En ciertas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor de ovario. En algunas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor de pulmón. En ciertas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor pancreático. En ciertas divulgaciones del presente documento, el tumor es un tumor de mama.

50 La presente divulgación proporciona además métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión a VEGF/DLL4 a un sujeto. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a VEGF, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a DLL4, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une a VEGF y DLL4, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a VEGF, interfiere con las interacciones del receptor VEGF/VEGF, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a DLL4, interfiere con las interacciones DLL4/Notch, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a tanto VEGF como DLL4, interfiere con las interacciones del receptor VEGF/VEGF y con las interacciones DLL4/Notch, e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se une a DLL4, y reduce la frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer.

65

La presente divulgación proporciona métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión a agente de unión a VEGF/DLL4 a un sujeto (por ejemplo, un sujeto en necesidad de tratamiento). En ciertas divulgaciones del presente documento, el sujeto es un humano. En ciertas divulgaciones del presente documento, el sujeto tiene un tumor canceroso. En ciertas divulgaciones del presente documento, el sujeto ha tenido un tumor removido.

El cáncer/tumor del sujeto, puede, en algunas divulgaciones del presente documento, ser refractario a ciertos tratamiento(s). Como un ejemplo no limitante, el cáncer del sujeto (o tumor) puede ser quimiorrefractario. En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer del sujeto puede ser resistente a la terapia anti-VEGF o terapia anti-DLL4, o ambas.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, glioblastoma, y cáncer de cabeza y cuello. En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer es cáncer colorectal o cáncer de colon. En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer es cáncer pancreático. En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer es cáncer de mama. En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer es cáncer de próstata. En ciertas divulgaciones del presente documento, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas divulgaciones del presente documento, el cáncer es un cáncer hematológico tal como leucemia o linfoma. En algunas divulgaciones del presente documento, la leucemia o linfoma es una leucemia de células B o linfoma. En algunas divulgaciones del presente documento, la leucemia o linfoma es una leucemia o linfoma de células T. En algunas divulgaciones del presente documento, el cáncer hematológico es leucemia mielogenosa aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, leucemia de células capilares, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células T cutáneo, o leucemia linfoblástica aguda de células T.

La divulgación también proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en donde la enfermedad o trastorno se asocia con la angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, la enfermedad o trastorno se asocia con angiogénesis aberrante. En algunas divulgaciones del presente documento, la enfermedad o trastorno se asocia con angiogénesis incrementada. De esta manera, la presente invención proporciona métodos para modular la angiogénesis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los agentes de unión a VEGF/DLL4 descrito en la presente. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une al VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo que se une a DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une al VEGF humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une al DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une al VEGF humano y DLL4 humano.

Se proporcionan adicionalmente métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en donde la enfermedad o trastorno se caracteriza por un nivel incrementado de células madre y/o células progenitoras. En algunas divulgaciones del presente documento, os métodos de tratamiento comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión a VEGF/DLL4, polipéptido, o anticuerpo al sujeto.

En ciertas divulgaciones del presente documento de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al VEGF humano y DLL4 humano. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente al DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 59), o YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ

ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y un segundo sitio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22). En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:17), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19), y el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:16); y en donde tanto el primero como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22).

En ciertas divulgaciones del presente documento de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 58, o SEQ ID NO: 64, y una primera región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:9, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:10, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:58, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo biespecífico VEGF/DLL4 comprende una primera región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:11, una segunda región variable de cadena pesada que tiene por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:64, y una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO:12.

En algunas divulgaciones de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo anti-VEGF. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo 219R45. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R79. En algunas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R75. En algunas divulgaciones del

presente documento, el anticuerpo anti-DLL4 es un anticuerpo 21R83. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R45. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R79. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R75. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R83. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R45 y un segundo sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R79. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R45 y un segundo sitio de litación a antígeno del anticuerpo 21M18. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R75. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R45 y un segundo sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21R83. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 21R45-MB-21M18. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 21R45-MB-21R79. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 21R45-MB-21R75. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 es el anticuerpo biespecífico 21R45-MB-21R83.

La presente divulgación proporciona además las composiciones farmacéuticas que comprende los agentes de unión descrito en la presente. En ciertas divulgaciones del presente documento, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento tumoral y/o para tratar el cáncer en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano).

En ciertas divulgaciones del presente documento, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprende anticuerpos biespecíficos, en donde por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %, por lo menos aproximadamente 98 %, por lo menos aproximadamente 99 % de los anticuerpos en la composición son anticuerpos biespecíficos o anticuerpos heterodiméricos. En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos IgG (por ejemplo, IgG2 o IgG1). En ciertas divulgaciones del presente documento, menor que aproximadamente 10 %, menor que aproximadamente 5 %, menor que aproximadamente 2 % o menor que aproximadamente 1 % de los anticuerpos totales en las composiciones son anticuerpos monoespecíficos o anticuerpos homodiméricos. En ciertas divulgaciones del presente documento, los anticuerpos en la composición por lo menos aproximadamente 98 % heterodiméricos.

En ciertas divulgaciones del presente documento, las formulaciones se preparan para almacenamiento y uso al combinar un anticuerpo o agente purificado de la presente divulgación con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un portador o excipiente). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, soluciones amortiguadoras no tóxicas tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservadores tales como cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, fenol, butilo o alcohol bencílico, alquil-parabenos, tales como metil o propil- parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol; polipéptidos de peso molecular bajo (por ejemplo, menor que aproximadamente 10 residuos de aminoácido); proteínas tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; los aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tales como, sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal tal como complejos de proteína Zn; y surfactantes no iónicos tal como TWEEN o polietilenglicol (PEG). (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, 2005, University of the Sciences, Filadelfia, PA*).

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en cualquier variedad de formas para cualquier tratamiento local sistémico. La administración puede ser tópica por parches epidérmicos o transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, rocíos, líquidos, y polvos; pulmonar por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador, intratraqueal, e intranasal; oral; o parenteral incluyendo intravenosa, intraarterial, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular (por ejemplo, inyección o infusión), o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en una forma de dosificación unitaria. Tales formulaciones incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios. En las composiciones sólidas tales como tabletas el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los ingredientes para la formación de tabletas convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y diluyentes (por ejemplo, agua). Estos se pueden usar para formar una composición de pre- sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica de la misma. La composición de preformulación sólida

luego se subdivide en formas de dosificación unitarias de un tipo descrito en lo anterior. Las tabletas, píldoras, etc., de la formulación o composición se pueden recubrir o de otra manera componer para proporcionar una forma de dosificación que permite la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente exterior. Adicionalmente, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o que se retarde en la liberación. Varios materiales se puede usar para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes o anticuerpos de unión a VEGF/DLL4 o descritos en la presente también se pueden atrapar en microcápsulas. Tales 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 administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, 2005, University of the Sciences en Filadelfia, PA.*

En ciertas divulgaciones del presente documento, las formulaciones farmacéuticas incluyen un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente divulgación formado en complejo con liposomas. Los métodos para producir liposomas son bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo. Por ejemplo, algunos liposomas se pueden generar por evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se pueden extrudir a través de filtros de tamaño de poro definidos para producir liposomas con el diámetro deseado.

En ciertas divulgaciones del presente documento, las preparaciones de liberación sostenidas se pueden producir. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), donde las matrices están en la forma de artículos formados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Ejemplos adicionales de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, tales como poli (2- hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilacturos, copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L- glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como LUPRON DEPOT^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), isobutirato de acetato de sacarosa, y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico.

En ciertas divulgaciones del presente documento, además de administrar un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo), el método o tratamiento comprende además administrar por lo menos un agente terapéutico adicional. Un agente terapéutico adicional se puede administrar antes de, concurrentemente con, y/o subsecuentemente a, la administración del agente de unión a VEGF/DLL4. Las composiciones farmacéuticas que comprende un agente de unión a VEGF/DLL4 y el agente(s) terapéutico adicional también se pueden proporcionar. En algunas divulgaciones del presente documento, el por lo menos un agente terapéutico adicional comprende 1, 2, 3, o más agentes terapéuticos adicionales.

La terapia de combinación con por lo menos dos agentes terapéuticos usa frecuentemente agentes que trabajan por mecanismos de acción diferentes, aunque no se requiere. La terapia de combinación que usa agentes con diferentes mecanismos de acción puede dar por resultado efectos de aditivo o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que se use en la monoterapia, reduciendo de esta manera los efectos secundarios tóxicos y/o incrementando el índice terapéutico de por lo menos uno de los agentes. La terapia de combinación puede disminuir la probabilidad de que las células cancerosas resistentes se desarrollen. En algunas divulgaciones del presente documento, la terapia de combinación comprende un agente terapéutico que afecta principalmente (por ejemplo, inhibe o extermina) células no tumorigénicas y un agente terapéutico que afecta principalmente (por ejemplo, inhibe o extermina) CSCs tumorigénicos.

Las clases útiles de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina, auristatinas, aglutinantes de la hendidura menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes de alquilación (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatina, mono(platino) , bis(platino) complejos de platina trinucleares y carboplatina), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sintetizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etoposidos, pirimidinas fluoradas, ionoforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, antimetabolitos de purina, puomicinas, sintetizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca, o similares. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un agente de alquilación, un antimetabolito, un antimitótico, un inhibidor de topoisomerasa o un inhibidor de angiogénesis. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un complejo de platino tal como carboplatina o cisplatina. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente terapéutico adicional es un complejo de platino en combinación con un taxano.

Los agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con los agentes de unión a VEGF/DLL4 incluyen agentes quimioterapéuticos. De esta manera, en algunas divulgaciones del presente documento, el método o tratamiento implica la administración de un agente o anticuerpo de unión a anti-VEGF de la presente divulgación en

combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. En algunas divulgaciones del presente documento, el método o tratamiento implica la administración de un agente o anticuerpo de unión a anti-DLL4 de la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. En algunas divulgaciones del presente documento, el método o tratamiento implica la administración de un anticuerpo biespecífico de la presente divulgación que se une a VEGF y DLL4, en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agente quimioterapéuticos diferentes.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes de alquilación tal como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo tal como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosfaoramida y trimetilolomelamima; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clorarfazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomycin, caliqueamicina, carabicina, caminomocina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofof, arabinosida de citosina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5- FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedores de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxana; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido (Ara-C); taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL) y docetaxel (TAXOTERE); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina (XELODA); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataasa, 4- hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es cisplatina. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es carboplatina. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es paclitaxel.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos que interfieren con la acción de una enzima de topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina HCl, citrato de daunorubicina, mitoxantrona HCl, actinomicina D, etopósido, topotecano HCl, tenipósido (VM-26), e irinotecano, así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de cualquiera de estos. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es irinotecano.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito. Un antimetabolito es un químico con una estructura que es similar a un metabolito requerido para las reacciones bioquímicas normales, todavía suficientemente diferente para interferir con una o más de las funciones normales de las células, tal como la división celular. Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato sódico, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinosido, tioguanina, 5- azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina, y cladribina, así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de cualquiera de estos. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es gemcitabina.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente quimioterapéutico es un agente antimetabólico, incluyendo, pero no limitado a, agentes que se unen a la tubulina. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente es un taxano. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente es paclitaxel o docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable, ácido, o derivado de paclitaxel o docetaxel. En ciertas divulgaciones del presente documento, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel unido a albúmina (ABRAXANE), DHA-paclitaxel, o PG-paclitaxel. En ciertas divulgaciones del presente documento alternativas, el agente antimetabólico comprende un alcaloide de la vinca, tal como vincristina, vinblastina, vinorelbina, o vindesina, o sales

farmacéuticamente aceptables, ácidos, o derivados de los mismos. En algunas divulgaciones del presente documento, el agente antimitótico es un inhibidor de quinesina Eg5 o un inhibidor de una cinasa mitótica tal como Aurora A o Plk1. En ciertas divulgaciones del presente documento, donde el agente quimioterapéutico administrado en combinación con un agente de unión a VEGF/DLL4 es un agente antimitótico, el cáncer o tumor que se trata es cáncer de mama o un tumor de mama.

En algunas divulgaciones del presente documento, un segundo agente terapéutico comprende un agente tal como una molécula pequeña. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención con una molécula pequeña que actúa como un inhibidor contra las proteínas asociadas a tumor adicionales incluyendo, pero no limitado a, EGFR, ErbB2, HER2, y/o VEGF. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de la trayectoria Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de la molécula pequeña de la ruta Wnt. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de la ruta BMP. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña que inhibe la señalización de β -catenina.

En algunas divulgaciones del presente documento, un segundo agente terapéutico comprende una molécula biológica, tal como un anticuerpo. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención con otros anticuerpos contra proteínas asociadas a tumor adicionales que incluyen, pero no limitado a, anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2, HER2, y/o VEGF. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un anticuerpo marcador de células madre anticancerosas. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se une a un componente de la trayectoria Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se une a un componente de la ruta Wnt. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la trayectoria Notch. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la ruta Wnt. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de anticuerpo de la ruta BMP. En algunas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que inhibe la señalización de p-catenina. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un inhibidor o modulador de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo receptor anti-VEGF o VEGF). En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo agente terapéutico es bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX), o cetuximab (ERBITUX). La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una formulación farmacéuticamente individual o usando formulaciones separadas, o a la administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.

Adicionalmente, el tratamiento con un agente de unión a VEGF/DLL4 descrito en la presente puede incluir tratamiento de combinación con otras moléculas biológicas, tal como una o más citocinas (por ejemplo, linfocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral, y/o factores de crecimiento) o se pueden acompañar por la remoción quirúrgica de tumores, células cancerosas, o cualquier otra terapia evaluada necesaria por un médico tratante.

En ciertas divulgaciones del presente documento, el tratamiento implica la administración de un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente invención en combinación con terapia de radiación. El tratamiento con un agente de unión a VEGF/DLL4 puede presentarse antes, concurrentemente con, o subsecuente a la administración de la terapia de radiación. Los programas de dosificación para tal terapia de radiación se pueden determinar por el profesional médico experto.

Se apreciará que la combinación de un agente de unión a VEGF/DLL4 y un agente terapéutico adicional se puede administrar en cualquier orden o concurrentemente. El tratamiento con un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se puede presentar antes, concurrentemente con, o subsecuente a la administración de las quimioterapias. La administración combinada puede incluir coadministración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o usando formulaciones separadas, coadministración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine empíricamente por el profesional experto. Los programas de preparación y dosificación para tal quimioterapia también se describen en *The Chemotherapy Source Book*, 4ª Edición, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.

En algunas divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 se administrará a pacientes que se han sometido previamente al tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras divulgaciones del presente documento, el agente de unión a VEGF/DLL4 y un segundo agente terapéutico se administrarán sustancialmente de manera simultánea o concurrentemente. Por ejemplo, un sujeto se le puede administrar un agente

de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) mientras que se somete a un curso de tratamiento con un segundo agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia). En ciertas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 1 año del tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas divulgaciones del presente documento alternativas, un agente de unión a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 10, 8, 6, 4, o 2 meses de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 4, 3, 2, o 1 semanas de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 se administrará dentro de 5, 4, 3, 2, o 1 días de cualquiera tratamiento con un segundo agente terapéutico. Se apreciará adicionalmente que los dos (o más) agentes o tratamientos se pueden administrar al sujeto dentro de una cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente de manera simultánea).

Para el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente divulgación depende del tipo de enfermedad que se trata, la gravedad y curso de la enfermedad, la sensibilidad de la enfermedad, si el agente de unión a VEGF/DLL4 o anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, el historial clínico del paciente, y así sucesivamente, todo en la discreción del médico que trata. El agente o anticuerpo de unión a VEGF/DLL4 se puede administrar una vez o como una serie de tratamientos separados durante varios días a varios meses, o hasta que se lleve a cabo una cura o se logre una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y vararán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o agente individual. El médico que administra puede determinar las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación, y velocidades de repetición. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosificación de un agente o anticuerpo de unión a VEGF/DLL4 es de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosificación del anticuerpo u otro agente de unión a VEGF/DLL4 es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosificación se puede administrar una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente, o al año. En ciertas divulgaciones del presente documento, el anticuerpo u otro agente de unión a VEGF/DLL4 se administra una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada mes.

En algunas divulgaciones del presente documento, un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se puede administrar en una dosis de "carga" más alta inicial, seguido por una o más dosis más bajas. En algunas divulgaciones del presente documento, la frecuencia de administración también puede cambiar. En algunas divulgaciones del presente documento, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis inicial, seguido por dosis adicionales (o dosis "de mantenimiento") una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez cada mes. Por ejemplo, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguido por una dosis de mantenimiento semana de, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguido por dosis de mantenimiento de, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender administrar tres dosis iniciales durante 3 semanas, seguido por dosis de mantenimiento de, por ejemplo, la misma cantidad cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis inicial seguido por dosis adicionales cada 3 semanas o una vez al mes. El médico que trata puede estimar las velocidades de repetición para la dosificación basado en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. El progreso de la terapia se puede supervisar por técnicas y ensayos convencionales.

Como es conocido por aquellas personas de experiencia en el campo, la administración de cualquier agente terapéutico puede conducir a efectos secundarios y/o toxicidades. En algunos casos, los efectos secundarios y/o toxicidades son tan graves como para impedir la administración del agente particular en una dosis terapéuticamente efectiva. En algunos casos, la terapia de fármacos se debe descontinuar, y se pueden probar otros agentes. Sin embargo, muchos agentes en la misma clase terapéutica muestran frecuentemente efectos secundarios y/o toxicidades similares, lo que significa que el paciente tiene que detener ya sea la terapia, o si es posible, sufrir de los efectos secundarios desagradables asociados con el agente terapéutico.

Los efectos secundarios de los agentes terapéuticos pueden incluir, pero no se limitan a, urticaria, sarpullido, comezón, náusea, vomito, apetito disminuido, diarrea, escalofríos, fiebre, fatiga, molestias musculares y dolor, dolores de cabeza, presión arterial baja, presión arterial alta, hipocalemia, recuentos sanguíneos bajos, sangrado, y problemas cardiacos.

De esta manera, un aspecto de la presente divulgación se dirige a métodos para tratar cáncer en un paciente que comprende administrar un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente, que puede reducir los efectos secundarios y/o toxicidad asociadas con la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. Como se usa en la presente, "dosificación intermitente" se refiere a un régimen de

dosificación que usa un intervalo de dosificación de más de una vez a la semana, por ejemplo, dosificación de una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, etc. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para tratar cáncer en un paciente humano comprende administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente. En algunas divulgaciones del presente documento, un método para tratar cáncer en un paciente humano comprende administrar al paciente una dosis efectiva de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente, e incrementar el índice terapéutico del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 a aproximadamente una vez cada 2 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes de anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 a aproximadamente una vez cada 3 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende administrar una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 al paciente, y administrar dosis subsecuentes del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 aproximadamente una vez cada 4 semanas.

En algunas divulgaciones del presente documento, la dosis subsecuente en un régimen de dosificación intermitente son aproximadamente la misma cantidad o menor que la dosis inicial. En otras divulgaciones del presente documento, la dosis subsecuente es una cantidad mayor que la dosis inicial. Como es sabido por aquellas personas de experiencia en el campo, las dosis usadas variarían dependiendo de los objetivos clínicos que se logren. En algunas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. En algunas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 2,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 7,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 10 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 12,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 15 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial es de aproximadamente 20 mg/kg. En algunas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 0,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 2,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 5 mg/kg. En algunas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 7,5 mg/kg. En algunas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 10 mg/kg. En algunas divulgaciones del presente documento, las dosis subsecuentes son de aproximadamente 12,5 mg/kg.

En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2,5 mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2,5 mg/kg una vez cada 2 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5 mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 2 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2,5 mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2,5 mg/kg una vez cada 3 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5 mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 3 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 2,5 mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 2,5 mg/kg una vez cada 4 semanas. En algunas divulgaciones del presente documento, el régimen de dosificación intermitente comprende: (a) administrar al paciente una dosis inicial de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de aproximadamente 5 mg/kg y (b) administrar dosis subsecuentes de aproximadamente 5 mg/kg una vez cada 4 semanas. En ciertas divulgaciones del presente documento, la dosis inicial y la dosis de mantenimiento son diferentes, por ejemplo, la dosis inicial es de aproximadamente 5 mg/kg y la dosis subsecuente son de aproximadamente 2,5 mg/kg. En ciertas divulgaciones del presente documento, un régimen de dosificación intermitente puede comprender una dosis de carga, la dosis inicial es de aproximadamente 20 mg/kg y las dosis subsecuentes son de aproximadamente 2,5 mg/kg o aproximadamente 5 mg/kg administradas una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez cada 4 semanas.

- Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para reducir la toxicidad de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en un paciente humano que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente. Otro aspecto de la presente invención se dirige a métodos para reducir los efectos secundarios de un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en un paciente humano que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 usando un régimen de dosificación intermitente.
- 5
- 10 La elección del método de administración para la dosis iniciales y subsecuentes se hace de acuerdo con la capacidad del paciente animal o humano de tolerar la introducción del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 en el cuerpo. De esta manera, en cualquiera de los aspectos y/o divulgaciones del presente documento descritas en la presente, la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 puede ser mediante inyección intravenosa o intravenosamente. En algunas divulgaciones del presente documento, la administración es por infusión intravenosa.
- 15 En cualquiera de los aspectos y/o divulgaciones del presente documento descritas en la presente, la administración del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 puede ser por una vía no intravenosa.

V. Kits que comprenden los agentes de unión a VEGF/DLL4

- 20 La presente divulgación proporciona kits que comprenden los agentes de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, anticuerpos) descritos en la presente y que se pueden usar para llevar a cabo los métodos descritos en la presente. En ciertas divulgaciones del presente documento, un kit comprende por lo menos un anticuerpo purificado contra VEGF y/o DLL4 en uno o más contenedores. En algunas divulgaciones del presente documento, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para llevar a cabo un ensayo de detección, incluyendo todos los
- 25 controles, indicaciones para llevar a cabo los ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de los resultados. Una persona experta en el campo reconocerá fácilmente que los agentes de unión a VEGF/DLL4 dados a conocer de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en el campo.
- 30 Se proporcionan además kits que comprenden un agente de unión a VEGF/DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4), así como por lo menos un agente terapéutico adicional. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo (o más) agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. En ciertas divulgaciones del presente documento, el segundo (o más) agente terapéutico es un inhibidor de angiogénesis.
- 35 Las realizaciones de la presente descripción se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se describen en preparación detallada en ciertas divulgaciones del presente documento de la presente descripción y métodos para usar los anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para aquellas personas expertas en el campo que muchas modificaciones, tanto materiales como métodos, se pueden practicar sin apartarse del alcance de la presente descripción.
- 40

Ejemplos

Ejemplo 1

- 45 Afinidades de unión de los anticuerpos anti-VEGF/anti-DLL4

Las K_D s de los anticuerpos parenterales anti-VEGF 219R45 (formato IgG), anti-DLL4 21R79 (formato IgG), anti-DLL4 21M18 (formato IgG) y anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se determinaron usando un sistema Biacore 2000 de Biacore LifeSciences (GE Healthcare). Proteínas de DLL4-Fc humanas o DLL4-Fc de ratón recombinantes se inmovilizaron sobre chips de carboxilo CM5 usando química basada en amina estándar (NHS/EDC) y se bloquearon con etanolamina. La VEGF_{i65} humana o VEGF_{i65} de ratón recombinantes se biotinilaron y se inmovilizaron sobre chips de estreptavidina. Los anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de 100 nM a 0,78 nM

50 en HBS-P (HEPES 0,01M pH 7.4, NaCl 0,15M, 0,005 % v/v de Polisorbato 20). Para cada anticuerpo, las 8 diluciones se inyectaron secuencialmente sobre un chip específico. Los datos cinéticos se recolectaron a través del tiempo y se ajustaron usando ecuación de ajuste global simultáneo para producir constantes de afinidad (valores K_D) para cada anticuerpo biespecífico.

55

60

65

Tabla 3

Anticuerpo	hVEGF (nM)	mVEGF(nM)	hDLL4 (nM)	mDLL4 (nM)
219R45	0,67	22,9	NB	NB
21M18	NB	NB	<0,1	NB
21R79	NB	NB	<0,1	NB
219R45-MB-21M18	0,36	25,5	16	NB
219R45-MB-21R79	0,68	12,5	0,53	NB

Como se muestra en la Tabla 3, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tuvo una constante de afinidad (K_d) para el VEGF humano de 0,36 nM y una K_D para el DLL4 humano de 16 nM. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tuvo una K_D para el VEGF humano de 0,68 nM y una K_D para el DLL4 humano de 0,53 nM. Ambos anticuerpos biespecíficos mostraron unión más débil al VEGF de ratón como es comparado con el VEGF humano y ningún anticuerpo se ligó al DLL4 de ratón. De esta manera, ambos anticuerpos biespecíficos mostraron afinidad de unión similar al VEGF humano y 219R45-MB-21R79 mostró aproximadamente una unión 30 veces más potente al DLL4 humano que el 219R45-MB-21M18. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 tuvo una afinidad de unión similar a VEGF humano a pesar del hecho de que el anticuerpo biespecífico es monovalente para VEGF como es comparado con el anticuerpo parenteral bivalente.

Se identificaron varios anticuerpos anti-DLL4 adicionales que tuvieron afinidades de unión intermedias con las K_D s de 21M18 y 21R79. Dos de estos anticuerpos anti-DLL4 se usaron para producir anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R75 y 219R45-MB-21R83. Usando el sistema Biacore 2000 como se describe en lo anterior, las K_D s de los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21R75 y 219R45-MB-21R83 al de DLL4 humano se determinaron. Una comparación de la afinidad de unión al DLL4 humano de estos cuatro anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 se muestra en la Tabla 4.

Las CDRs para los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se muestran en la Figura 1A. La región variable de cadena pesada y cadena ligera SEQ ID NOs se muestran en la Figura 1B y la SEQ ID Nos de cadena pesada y cadena ligera (con o sin secuencia señal) como se muestra en la Figura 1C.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 comprende una (a) cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:75 depositado con American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, EUA, bajo las condiciones del Tratado de Budapest del 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA-___, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositado con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest del 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA-___, y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositado con el ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre de 2012, y se le asignó el número de designación PTA-13235.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:31 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA-___, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA-___, y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA-___.

En anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 y 219R45-MB-21R83 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:72 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 24 de octubre de 2012 y se le asignó el número de designación PTA-___, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación PTA-___, e (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012, y se le asignó el número de designación en PTA-___.

El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R75 comprende (a) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:74 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA-___, (b) una cadena pesada codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:33 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA-___ y (c) una cadena ligera codificada por el ADN que comprende SEQ ID NO:34 depositada con ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 21 de Septiembre del 2012 y se le asignó el número de designación PTA-___.

Tabla 4

Anticuerpo	CDR2 de cadena pesada	hDLL4 (nM)
219R45-MB-21M18	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	16,00
219R45-MB-21R79	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	0,53
219R45-MB-21R75	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	5,10
219R45-MB-21R83	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	1,30

Ejemplo 2

Ensayo HTRF para la unión simultánea de anticuerpos biespecíficos a VEGF humano y DLL4 humano

Para caracterizar las capacidades de unión de ciertos anticuerpos y/o mezcla de anticuerpos a tanto VEGF como DLL4, se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia resueltos en el tiempo homogéneo (HTRF). Los anticuerpos sometidos a prueba fueron los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, los anticuerpos parenterales 219R45 (anti-VEGF), 21M18 (anti-DLL4), 21R79 (anti-DLL4), una combinación de 219R45 y 21M18, una combinación de 219R45 y 21R79. Los anticuerpos o mezclas de anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de 3000 nM a 2,9 nM en solución amortiguadora de unión (1X de PBS, 0,1 % de gelatina, 0,1 % Polisorbato 20, fluoruro de potasio 400 mM) y se colocaron en una placa de 96 pocillos blancos. Un volumen igual de solución que contiene 4 µ/ml de hDLL4-Fc etiquetado con d2 y 21,4 ng/ml de hVEGF₁₆₅ etiquetado con tripato de Europio se agregaron a cada pocillo para un volumen final de 100 µl (concentraciones finales de fluoróforo aceptores y donadores fueron de 2 µg/ml y 10,7 ng/ml, respectivamente). Las placas de ensayo se incubaron durante 2 horas durante la noche y se leyeron sobre un lector de Micro placas SpectraMax M5e (Molecular Devices, Sunnyvale CA) en una longitud de onda de excitación de 314 nm.

Como se muestra en la Figura 2, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, fueron capaz de unirse tanto a hVEGF como a hDLL4 simultáneamente. De manera importante, ninguna de las combinaciones de los anticuerpos parenterales (es decir, 219R45 y 21M18 o 219R45 y 21R79) fueron capaces de unirse a VEGF y DLL4 simultáneamente. Estos resultados muestran claramente que los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 son capaces de funcionar de manera diferente que una simple mezcla de los dos anticuerpos individuales.

Ejemplo 3

Inhibición de la proliferación de HUVEC por anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4

Células HUVEC se obtuvieron de Lonza (Walkersville MD) y se cultivaron en un medio de crecimiento (M199, 10 % de FBS inactivado por calor (HI-FBS), 50 µ/ml de EGS, 1X de heparina, L-glutamina 1mM). Para de proliferación de HUVEC, una placa de 96 pocillos se prerrecubrió con 50 µl de 10 µg/ml de solución tipo I de colágeno de cola de rata (colágeno I en ácido acético 0,02 N) y se incubó a 4°C durante la noche. Después de la incubación, la placa se aspiró completamente para remover la solución de colágeno I no unida y se lavó una vez con 200 µl de DPBS. Las células HUVEC se removieron de la superficie de los matraces de crecimiento usando un reactivo subclón de células endoteliales y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se volvieron a suspender en un medio de inanición/ensayo (M199 y 2 % de HI-FBS, 1X de heparina, 5U/ml heparina-glutamina) en una densidad de 10⁵ células/ml. Las células se sembraron en una placa de ensayo recubierta con colágeno a 5000 células/pocillo, 50ul/pocillo. Las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C, se lavaron una vez, se volvieron a alimentar con 100 µl de medio de ensayo, y se incubaron durante la noche a 37°C. Al siguiente día, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, en anticuerpo parental 219R45, o el anticuerpo de control LZ1 se prepararon en una mezcla con VEGF humano (R&D Biosystems, Minneapolis MN). Los anticuerpos se diluyeron en serie 5 veces de 20 µM a 0,25 nM en solución amortiguadora de ensayo en combinación con hVEGF (concentración final 5ng/ml). La mezcla se pre-incubó a 37°C durante 2 horas. El medio se removió de la placa de ensayo, y 100pl de la mezcla de anticuerpo/hVEGF se agregó a cada pocillo. Después de 3-4 días de incubación, el medio se removió y una alícuota reciente de la mezcla de anticuerpo/hVEGF se agregó a cada pocillo y se dejó incubar durante otros 4 días. En el día 7,20 µl de reactivo Azul Alamar (Invitrogen, Carlsbad, CA) se agregó a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 5-6 horas. La placa se leyó con un lector de Micro placas SpectraMax M5e (Molecular Devices, Sunnyvale CA) usando una longitud de onda de excitación de 539 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

Como se muestra en la Figura 3, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, así como el anticuerpo anti-VEGF parental 219R45 mostraron proliferación de HUVEC. Estos resultados muestran que los anticuerpos biespecíficos fueron capaces de inhibir la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC.

Ejemplo 4

Inhibición de la señalización Notch inducida por DLL4 por anticuerpos específicos.

Células PC3 humanas se transfectaron con un vector de expresión que codifica un receptor Notch2 humano de longitud completa y un vector reportero de luciferasa de luciérnaga (reportero 8xCBF-luciferasa) que es responsable de la señalización Notch. Las células también se transfectaron con un reportero de luciferasa Renilla (Promega, Madison WI) como un control interno para la eficiencia de la transfección. La proteína DLL4 humana purificada se recubrió sobre placas de 96 pocillos a 100ng/pocillo y las células PC3-luc que expresan Notch2 se agregaron a los pocillos. Anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, anticuerpos anti-DLL4 parenterales 21M18, 21R79 o un anticuerpo de control LZ1 se diluyeron en serie 5 veces de 20 ug/ml a 0,064 ug/ml, se agregaron a los pocillos apropiados, y se incubaron durante la noche. La actividad de la luciferasa se determinó usando un kit de ensayo de luciferasa doble (Promega, Madison, WI) con actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada con la actividad de luciferasa Renilla.

Como se muestra en la Figura 4, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 y los anticuerpos anti-DLL4 parenterales 21M18 y 21R79 inhibieron la señalización Notch inducida por DLL4. El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 inhibió la señalización Notch inducida por DLL4 solamente en consideraciones de anticuerpo altas. Estos resultados mostraron que el anticuerpo biespecífico anticuerpo 219R45-MB-21R79, y a un grado menor del anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18, fueron capaces de inhibir la señalización Notch inducida por DLL4. De esta manera, en combinación con los resultados presentados en el Ejemplo 3, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79 y 219R45-MB-21M18, habían mostrado la capacidad de inhibir las funciones de señalización y/o proliferación inducidas tanto por VEGF como de DLL4.

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por un anticuerpo biespecífico en un modelo de injerto de piel humana.

Un modelo de injerto de piel humana se ha reportado que comprende un injerto de piel humana y células tumorales humanas. Se establece un injerto de piel humana y luego las células tumorales humanas se implantan en el injerto de piel, permitiendo que las células tumorales se desarrollen en un entorno con estroma y vasculatura humana (Tahtis y colaboradores, 2003, Mol. Cancer Ther. 2:229-737). Las muestras de piel humana se obtuvieron de tejido de prepucio neonatal y se injertó en el flanco lateral de ratones NOD- SCID. Después del establecimiento del injerto de piel, células tumorales de colon OMP-C8 etiquetadas con luciferasa (20,000 células) se inyectaron intradérmicamente en la piel humana. El crecimiento tumoral se supervisó por formación de imágenes de bioluminiscencia usando un sistema de formación de imágenes IVIS (Caliper Life Sciences, Mountain View, CA). Los tumores se dejaron desarrollar hasta que alcanzaron $1,2 \times 10^6$ fotones por segundo. Los ratones que llevan tumor (n = 6 ratones/grupo) se eligieron al azar y se trataron con Ab de control, anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab, o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18. Los animales se trataron una vez a la semana y los anticuerpos se administraron intraperitonealmente en una dosis de 25 mg/kg. El crecimiento tumoral se supervisó por formación de imágenes de bioluminiscencia en los días indicados.

Como se muestra en la Figura 5, tanto el anticuerpo anti-hDLL4 21M18 como el anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab inhibieron el crecimiento tumoral en este modelo de injerto de piel humana/tumor humano. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 fue más efectivo que ya sea el anticuerpo anti-DLL4 o el anticuerpo anti-VEGF solo. Estos datos muestran la utilidad fijar como objetivo simultáneamente el DLL4 y VEGF con un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 6

Tumorigenicidad de células tumorales pancreáticas OMP-PN8 después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4

Ratones que llevan tumores pancreáticos OMP-PN8 se trataron con anticuerpo de control (15 mg/kg), anticuerpo anti-hDLL4 21M18 (15 mg/kg), anticuerpo anti-VEGF de bevacizumab (15 mg/kg), o anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 o 219R45-MB-21R79 (30 mg/kg) con o sin gemcitabina (70 mg/kg). Después de cuatro semanas de tratamiento, los tumores se recolectaron, se procesaron a suspensiones de células individuales y las células tumorales humanas se purificaron por agotamiento inmunomagnético de células de murino. 90 células tumorales humanas de cada grupo del tratamiento se transfirieron a un nuevo cohorte de ratones (n = 10 ratones/grupo). Los tumores se dejaron desarrollar durante 55 días sin ningún tratamiento y los volúmenes del tumor se midieron con calibradores electrónicos.

La Figura 6 muestra el volumen de tumor de los ratones individuales en cada grupo. Las células aisladas de ratones tratados con anticuerpo anti-hDLL4 21M18 tuvieron un tumorigenicidad disminuida en gran medida, 5 de 10 ratones tuvieron tumores, como es comparada con las células aisladas de ratones tratados con el anticuerpo de control donde 9 de 10 ratones tuvieron tumores. La reducción en la frecuencia del crecimiento tumoral indica una reducción en la frecuencia de células madre cancerosas. En contraste, el tratamiento con bevacizumab no dio por resultado reducción de la frecuencia del crecimiento tumoral, 10 de 10 ratones tuvieron tumores. Similar al bevacizumab, el tratamiento

con gemcitabina como un solo agente no tuvieron efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral ya que 10 de 10 ratones tuvieron tumores. Los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 ambos redujeron la frecuencia del crecimiento tumoral (5 de 10 ratones tuvieron tumores y 4 de 10 ratones tuvieron tumores, respectivamente). El tratamiento de combinación con gemcitabina pareció que no tiene efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral. Estos datos indican que el DLL4 objetivo reduce la frecuencia de células madre cancerosas mientras que el VEGF objetivo solo no lo hace. De manera importante, estos datos indican que la actividad anti-CSC del anticuerpo anti-DLL4 se retiene en un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 7

10 ELISA de Anticuerpo Biespecífico

15 El VEGF (ATGEN, Corea del Sur) se recubrió sobre placas Nunc maxisorb a 2 μ g/ml (100 μ g/pocillo) y se incubó durante la noche a 2-8°C. Los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75, y 219R45-MB-21R83 se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo (1x de PBS, 0,1 % de gelatina 0,1 % de Polisorbato-20, pH 7.4) que contiene 2 μ g/ml de biotina-DLL4-hFc. Los anticuerpos se diluyeron en serie 3 veces de 500 ng/ml a 0,008 ng/ml. Las muestras de anticuerpo se incubaron durante 2 horas en solución amortiguadora de bloqueo que contiene la biotina-DLL4-hFc. Después de la incubación, las muestras de anticuerpo se transfirieron a la placa de ensayo recubierta con VEGF (100 ul/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Estreptavidina- HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se agregó a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. El sustrato TMB se agregó a los pocillos con un desarrollo de color de 10 minutos y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se leyó a 450-650 nm y los datos se analizaron usando el ajuste de 4 parámetros dentro del programa de análisis Softmax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

25 La Figura 7 muestra las curvas de titulación de los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 (círculos abiertos), 219R45-MB-21R79 (cuadrados abiertos), 219R45-MB- 21R75 (triángulos abiertos), y 219R45-MB-21R83 (triángulos abiertos) en comparación con un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de referencia (círculos sólidos). Las potencias relativas para los anticuerpos biespecíficos como es comparado con el anticuerpo biespecífico de referencia se muestran en la Tabla 5.

30 Tabla 5

Anticuerpo	Potencia Relativa (%)
219R45-MB-21M18	67
219R45-MB-21R79	501
219R45-MB-21R75	422
219R45-MB-21R83	222

35 El anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21R79 que el más potente, aproximadamente 7 veces más potente que 219R45-MB- 21M18, que reflejó la afinidad más alta del sitio de unión a antígeno 21R79.

45 Ejemplo 8

Producción de Anticuerpos Biespecíficos

50 Los anticuerpos biespecíficos se produjeron usando una línea de células GS-CHO. Las células CHOK1SV (Lonza Biologics) se transfectoraron a través de electroporación con el gen(s) de interés acoplado con glutamina sintetasa (GS) como el marcador seleccionable. Los transfectantes y subclones se clasificaron para la productividad de anticuerpos y los productores altos se seleccionaron para la producción de mayor escala. Las células se desarrollaron usando un proceso de lote de alimentación y biorreactores de lote de alimentación. El anticuerpo acumulado en el fluido de cultivo de células recolectadas (HCCF) se aisló y se purificó usando técnicas de cromatografía.

55 Líneas de células de anticuerpo biespecíficos 219R45-MB- 21M18.010.017 y 219R45-MB-21R79.017.003 se cultivaron en biorreactores de tanque agitados de 5L durante 14 días. Las líneas de células 219R45-MB-21M18.010.017 produjeron un título de anticuerpo final de 3,0 g/L y la línea de células 219R45-MB-21R79.017.003 produjo un título de anticuerpo final de 0,8 g/L. Las líneas de células 219R45-MB-21R75.101 y 219R45-MB-21R83.113 se cultivaron en sistemas de biorreactor WAVE de 25L (GE Healthcare) usando un proceso de lote de alimentación que logró títulos de anticuerpo finales de 0,4 g/L. Las líneas de células de anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18AG.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45- MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB-21R79AG.072.014 y 219R45-MB- 21R83AG.129.003 se cultivaron en biorreactores de tanque de agitado de 5 L durante 14 - 15 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.138.007 produjo un título de anticuerpo final de 1,0 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.038.009 produjo un título de anticuerpo final de 1,6 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.142.002 produjo un título de anticuerpo final

de 2,6 g/L después de 14 días. La línea de células 219R45-MB-21R79AG.072.014 produjo un título de anticuerpo final de 2,1 g/L después de 15 días. La línea de células 219R45-MB-21M18AG.038.009 produjo un título de anticuerpo final de 2,4 g/L después de 15 días. El fluido de cultivo se recolectó por filtración de cada una de estas cuatro líneas de células y se sometió a la cromatografía de afinidad de proteína A. La columna de proteína A se lavó con una serie de soluciones amortiguadoras y los anticuerpos se eluyeron usando una solución amortiguadora de elución con pH bajo. La caracterización inicial de la pureza de los anticuerpos biespecíficos se llevó a cabo usando cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-HPLC) y en foque isoelectrico (IEF).

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se usó para determinar la pureza del producto de anticuerpo. La SEC es un método cromatográfico bien conocido en el cual las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) en solución se separan por su tamaño. La SEC se puede usar para distinguir un producto de anticuerpo de agregado y/o impurezas, y para determinar el porcentaje del producto de anticuerpo como es comparado con la mezcla total. Como se usa en la presente, la SEC no distingue entre un anticuerpo homomérico y un anticuerpo biespecifico heterodimérico.

El enfoque isoelectrico capilar de imagen (icIEF) se usó para determinar la identidad y pureza de los heterodímeros de anticuerpo biespecifico. Usando el icIEF, las isoformas de carga del anticuerpo se separan de acuerdo con su pl y el resultado es una "huella" de la distribución de carga del anticuerpo. El método icIEF también puede servir como una determinación de pureza al separar los heterodímeros de anticuerpo biespecifico por su pl distinta de cualquiera de los productos o impurezas de homodímeros.

Las muestras de anticuerpo biespecíficos se analizaron por icIEF en un instrumento ProteinSimple ICE280 (ProteinSimple, Santa Clara, CA). Para este análisis, una mezcla de proteínas se introduce en un capilar, se aplica voltaje alto a través del capilar y los anfólitos establecen un gradiente de pH lineal a lo largo de la longitud del capilar. Bajo la influencia del campo eléctrico, los marcadores de pl y la mezcla de protección ambos migran la longitud del capilar hasta que se alcanza un valor de pH donde la carga neta es cero. Una vez enfocado, el instrumento ICE280 usa una detección de formación de imágenes de columna completa con una cámara UV de 280-nm para supervisar el patrón de las isoformas de proteína dentro del capilar. El electroferograma resultante se calibra usando marcadores de pl internos y se integra para establecer el porcentaje de área respectivas de las isoformas cargadas diferentes de la mezcla de proteínas. Los perfiles de carga de varios anticuerpos específicos anti-VEGF/anti-DLL4 se muestran en la Figura 8. Para este experimento, se diluyeron eluatos de Proteína A con agua MilliQ a una concentración de 6,6 mg/ml. Un total de 18 µl pl de la muestra se mezclaron con 100 µl de 8M urea, 70 µl de 0,5 % de metilcelulosa, 8 µl de 3-10 Pharmalyte, 2 µl de marcador de pl alto y 2 µl de marcador de pl bajo a un volumen final de 200 µl pl. La Tabla 6 muestra el porcentaje del producto de anticuerpo de las líneas de células 219R45-MB- 21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB-21R75.101, 219R4 5-MB-21R8 3.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB- 21M18AG.038.009, 219R4 5-MB-21M18AG.142.002, 219R45-MB- 21R79AG.072.014, y 219R45-MB-21R83AG.129.003 después de la cromatografía de afinidad de Proteína A como es determinado por SEC-HPLC. La Tabla 6 también muestra el porcentaje de los anticuerpos heterodiméricos de las líneas de células 219R45- MB-21M18.010.017, 219R45-MB-21R79.017.002, 219R45-MB- 21R75.101, 219R4 5-MB-21R8 3.113, 219R45-MB-21M18.138.007, 219R45-MB-21M18AG.038.009, 219R45-MB-21M18AG.142.002, 219R45- MB-21R79AG.072.014, y 219R45-MB-21R83AG.129.003 después de la cromatografía de afinidad de Proteína A como es analizado por icIEF.

Tabla 6

Línea de células	Titulación del Anticuerpo (g/L)	Pureza por SEC (%)	Pureza por IEF (% de heterodímero)
219R45-MB- 21M18.010.017	3,0	73,9	47,2
219R45-MB- 21R79.017.002	0,8	79,3	72,5
219R45-MB-21R75.101	0,4	91,2	84,9
219R45-MB-21R83.113	0,4	91,8	91,4
219R45-MB- 21M18.138.007	1,0	92,6	95,8
219R45-MB- 21M18AG.038.009	1,6	89,6	89,0
219R45-MB- 21M18AG.142.002	2,6	91,2	84,6
219R45-MB- 21R79AG.072.014	2,1	87,8	84,9
219R45-MB-21R83AG.129.003	2,4	89,4	90,5

La pureza del producto de anticuerpo biespecifico se puede incrementar adicionalmente por etapas de cromatografía adicionales. Después de la cromatografía de afinidad de Proteína A, la fracción de eluato se mantuvo en un pH bajo por no menos de 60 minutos a temperatura ambiente para la inactivación viral. La solución de anticuerpos (eluato de columna de Proteína A, pH ajustado) se cargó sobre una columna de intercambio aniónico potente. Las impurezas relacionadas con el producto y proceso unidas a la resina de cromatografía de intercambio aniónico y a la fracción de flujo pasante (producto de anticuerpo) se recolectó. En algunos casos, la pureza se mejoró adicionalmente mediante el uso de una resina de cromatografía multimodal tal como hidroxapatita de cerámica. En algunos casos, el

intercambio de solución amortiguadora del producto de anticuerpo se llevó a cabo usando técnicas de ultrafiltración y diafiltración, después de lo cual los excipientes se agregaron. El anticuerpo formulado se filtró estéril en contenedores estériles y se almacenó refrigerado o congelado. La pureza de los anticuerpos biespecíficos se volvió a evaluar usando SEC-HPLC y IEF.

5

Tabla 7

10

Línea de células	Pureza por SEC (%)	Pureza por IEF (% de heterodímero)
219R45-MB-21M18.010.017	98,9	98,5
219R45-MB-21R79.017.002	95,1	99,3
219R45-MB-21R75.101	97,2	98,2
219R45-MB-21R83.113	95,3	91,4
219R45-MB-21M18.138.007	98,1	100
219R45-MB-21M18AG.142.002	99,6	100
219R45-MB-21R79AG.072.014	98,2	100
219R45-MB-21R83AG.129.003	99,6	100

15

20

25

30

35

Como se muestra en la Tabla 7, la purificación de los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 con etapas de cromatografía adicional después de la Proteína A dio por resultado el aislamiento de los productos de anticuerpo que fueron 95 % a aproximadamente 99 % puros como es analizado por SEC. El análisis por IEF determinó que el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 purificado de la línea de células 219R45-MB-21M18.010.017 fue de 98,5 % heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R79.017.002 fue 99,3 % heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R75.101 fue 98,2 % heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R83.113 fue 91,4 % heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21M18.138.007 fue 100 % heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21M18AG.142.002 fue 100 % heterodimérico, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R79AG.072.014 fue 100 % heterodimérico, y el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 de la línea de células 219R45-MB-21R83AG.129.003 fue 100 % heterodimérico. Estos resultados mostraron que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico incrementó en gran medida el porcentaje de anticuerpos heterodiméricos como es comparado con la purificación con la cromatografía de Proteína A sola. La adición de una etapa de cromatografía multimodal tal como hidroxipatita de cerámica también puede mejorar la pureza monomérica (como es determinado por SEP-HPLC).

40

Ejemplo 9

Inhibición del crecimiento tumoral de colon OMP-C8 en el modelo de recurrencia de tumor *in vivo*

45

50

55

Suspensiones de células individuales de xenoinjertos de tumor de colon OMP-C8 (20,000 células) se inyectaron cutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 240mm³. Los ratones se eligieron al azar (n = 10 por grupo) y se trataron con anticuerpo anti-hDLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, una combinación de anticuerpos 21M18 y bevacizumab, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79, o el anticuerpo de control, todos en combinación con irinotecano. Los anticuerpos y el irinotecano se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se dosificaron a 7,5 mg/kg, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se dosificaron a 15 mg/kg, y el irinotecano se dosificó a 45 mg/kg. El irinotecano se dosificó durante cuatro semanas, tiempo en el cual, se discontinuó y la administración de los anticuerpos continuó. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media \pm SEM.

60

Como se muestra en la Figura 9, el anticuerpo anti-hDLL4 21M18 continuó mostrando crecimiento tumoral después de que se detuvo el tratamiento con irinotecano. En contraste, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab no fue capaz de inhibir el crecimiento de nuevo del tumor después de que se había detenido la administración de irinotecano. La combinación del anticuerpo anti-DLL4 21M18 y el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab dio por resultado mayor inhibición del crecimiento de nuevo del tumor que cualquier agente solo. Adicionalmente, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 fue más efectivo en inhibir el crecimiento de nuevo del tumor que la mezcla de los dos anticuerpos.

65

Ejemplo 10

Reducción en la tumorigenicidad de tumores de colon OMP-C8

Suspensiones de células individuales de xenoinjerto de tumor de colon OMP-C8 (20,000 células) se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 300mm³. Los ratones se eligieron al azar (n = 5 por grupo) y se trataron con anticuerpo anti-DLL4 21M18, anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, una combinación de anticuerpos 21M18 y bevacizumab, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21R79, o el anticuerpo de control, ya sea en combinación con irinotecano o sin irinotecano. Los anticuerpos e irinotecanos se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. Los anticuerpos 21M18 y bevacizumab se dosificaron a 7,5 mg/kg, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79 se dosificaron a 15 mg/kg, e el irinotecano se dosificó a 45 mg/kg. Los tumores se recolectaron después de 4 semanas, se procesaron en suspensiones de células individuales, y las células tumorales humanas se aislaron. 150 células tumorales de cada grupo experimental se inyectaron subcutáneamente en un nuevo cohorte de ratones (n = 10 por grupo) y los tumores se dejaron desarrollar sin tratamiento. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos.

Los volúmenes de tumor individuales en el día 68 se muestran en la Figura 10. El anticuerpo anti-DLL4 21M18, la combinación de 21M18 con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R79, y el irinotecano redujeron la frecuencia del crecimiento tumoral como agentes individuales. En contraste, el bevacizumab anti-VEGF como un solo agente no tuvo efecto en la frecuencia del crecimiento tumoral como es comparado con el anticuerpo de control. En los grupos tratados con una combinación de irinotecano y anticuerpos, el anticuerpo biespecífico 219R45-MB-21M18 tuvo el efecto más grande en la reducción de la frecuencia del crecimiento tumoral.

Ejemplo 11

Inhibición del crecimiento tumoral del colon OMP-C8 *in vivo*

Suspensiones de células individuales de xenoinjertos de tumor de colon OMP-C8 (50,000 células) se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones NOD/SCID de 6,8 semanas de edad. Los tumores se dejaron desarrollar durante 21 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 80mm³. Los ratones se eligieron al azar (n = 8 por grupo) y se trataron con el anticuerpo anti-DLL4 21M18, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R83, o el anticuerpo de control, ya sea solos o en combinación con irinotecano. Los anticuerpos y el irinotecano se dosificaron semanalmente por inyección en la cavidad intraperitoneal. El bevacizumab y los anticuerpos biespecíficos 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R75, 219R45-MB-21R79, y 219R45-MB-21R83 se dosificaron en 15 mg/kg, y el irinotecano se dosificó a 7,5 mg/kg. El crecimiento tumoral se supervisó y los volúmenes de tumor se midieron con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± SEM.

Como agentes individuales, los cuatro anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 mostraron actividad antitumoral mejorada relativa con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab. En combinación con el irinotecano, el tratamiento con los anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-DLL4 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R83 dio por resultado la inhibición más grande del crecimiento tumoral (Figura 11).

Después de la fase de tratamiento, las secciones de tumor se prepararon y se analizaron por tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Los tumores tratados con 219R45-MB-21M18 y 219R45-MB-21R83 en combinación con irinotecano mostraron regiones de tinción rosadas oscuras que proporcionan evidencia de calificación extensiva. Esto es característico del tejido tumoral sumamente necrótico.

Ejemplo 12

Estudio de toxicidad no de GLP de anticuerpos biespecíficos en monos cynomolgus

Un estudio de toxicidad no GLP en monos cynomolgus se inició para evaluar y comparar el perfil de toxicidad de algunos de los anticuerpos biespecíficos. Los animales se dosificaron con 0 mg/kg (control), 5 mg/kg (dosis baja), o 30 mg/kg (dosis alta) de anticuerpo biespecífico anti-DLL4/anti-VEGF (219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R83, o 219R45-MB-21R79) cada 2 semanas a través de infusión IV. 3 mujeres y 3 hombres se dosificaron en cada grupo. Después de 15 semanas, los pesos corporales medios fueron menores en los animales que recibieron la dosis alta de 219R45-MB-21R79 que en animales que recibieron la dosis alta de ya sea 219R45-MB-21R18 o 219R45-MB-21R83. Además, los niveles de albúmina de suero medios fueron menores en animales que recibieron 219R45-MB-21R79 que en aquellos que recibieron ya sea 219R45-MB-21R18 o 219R45-MB-21R83. Aunque preliminares en carácter, estos resultados tempranos sugieren que 219R45-MB-21R18 y 219R45-MB-21R83 pueden tener un perfil de toxicidad superior comparados con 219R45-MB-21R79.

Secuencias

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 21M18 (SEQ ID NO:1)

ES 2 938 628 T3

5 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKC
CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
10 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 21R79 (SEQ ID NO:2)

15 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKC
CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
20 VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal (subrayada) 219R45 (SEQ ID NO:3)

25 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMHWVRQAP
GQGLEWMDINP SNGRTSYKEKFKRRVTLSDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
30 WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVER

ES 2 938 628 T3

5 KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLKSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:4)

10 MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWF
QQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPW
TFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21M18 (SEQ ID NO:5)

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGLT VTVSSA
STKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHPK SNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
25 VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R79 (SEQ IDNO:6)

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGLT VTVSSA
STKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHPK SNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
35 VSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40 Cadena pesada sin secuencia señal predicha 219R45 (SEQ ID NO:7)

45 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINP SNGRTSY
KEKFKRRVTLSDVKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGLT VTVS
SASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHPK SNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK
50 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:8)

55 DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

60 Región variable de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGLT VTVSS

65 Región variable de cadena pesada 21R79 (SEQ ID NO:10)

ES 2 938 628 T3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSS

Región variable de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:11)

5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSDVKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGLVTVSS

Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:12)

10

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSTDFLTITISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

CDR1 de cadena pesada 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:13)

15

TAYYIH

CDR1 de cadena pesada alterna 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:79)

20

AYYIH

CDR2 de cadena pesada 21R79 (SEQ ID NO:14)

YIANYNRATNYNQKFKG

25

CDR2 de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:15)

YISSYNGATNYNQKFKG

30

CDR3 de cadena pesada 21R75, 21R79, 21R83, y 21M18 (SEQ ID NO:16)

RDYDYDVGMDY

CDR1 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:17)

35

NYWMH

CDR2 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:18)

40

DINPSNGRTSYKEKFKR

CDR3 de cadena pesada 219R45 (SEQ ID NO:19)

HYDDKYYPLMDY

45

CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:20)

RASESVDNYGISFMK

50

CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:21)

AASNQGS

CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:22)

55

QQSKEVPWTFGG

DLL4 humano con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:23)

60

65

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IE
AWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
5 GDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQP ICLSGCHEQNGYCSKPAECL
CRPGWQGRRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYGLHCE
10 HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR
GPSRMCRCPGFTGTYTELVSDCARNPCAHHGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS
IDACASSPCFN RATCYTDLSTDFVCNCPYGFVGSRCFFPVG

DLL4 humano sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:24)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL
20 SCLPGWTGEYCQQP ICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRRLCNECIPHNGCRHGTCST
PWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSE
ECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGAN
ACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCPGFTGTYTELVSDCAR
25 NPCAHHGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFN RATCYTDLSTDFVC
NCPYGFVGSRCFFPVG

Región N-Terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO:25)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQN

Dominio DSL de DLL4 humano (SEQ ID NO:26)

WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG
EYC

VEGF humano-A con secuencia señal (subrayada) (SEQ ID NO:27)

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFM DVYQRSYCHPIETLVD
IFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMR CGGCNDEGLECVPT EESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQH NKCECRPKKDRARQEKKSVRGK GKQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCC LMPWSLPG
45 PHPCGPC SERRKHLFVQDPQTCKC SCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

VEGF humano-A sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:28)

APMAEGGGQNHHEVVKFM DVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMR CGGC
50 CNDEGLECVPT EESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM SFLQH NKCECRPKKDRARQEKKSVRG
K GKQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCC LMPWSLPGPHPCGPC SERRKHLFVQDPQTCKC SC
KNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21M18 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:29)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCTCCGTGAAGATCTCC
60 TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCT
GGGCAGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCCGCTGACCTTACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCTACATG
GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCCTGTCTCCTCTGCCTCC
65 ACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC

ES 2 938 628 T3

5 GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAC
 TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
 TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGGTGCCTTCCCTCCAACCTCGGCACCCAGACCTACACC
 10 TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC
 TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTGTTC
 CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT
 GTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
 15 GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGT
 TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGAAGGT
 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
 CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGT
 20 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
 AACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGACCACCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTTCCCTGTACTCCGAAGTACCCTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
 TCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCCTACACCAGAAAGTCCCTGTCCCTG
 TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21R79 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:30)

25 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
 GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
 TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCAGCCTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCACCA
 GGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACCTACAACCGGGCCACCAACTACAAC
 30 CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCAACACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTACATG
 GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
 TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGCAGTGTCTCCGCCTCC
 ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGTCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACC
 GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAC
 35 TCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG
 TACTCCCTGTCTAGCGTGGTGGTGCCTTCCCTCCAACCTCGGCACCCAGACCTACACC
 TGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGC
 TGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTGTTC
 CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT
 40 GTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
 GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGT
 TCTGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGAAGGT
 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
 CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGT
 45 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
 AACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGACCACCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTTCCCTGTACTCCGAAGTACCCTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
 TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCCTACACCAGAAAGTCCCTGTCCCTG
 TCTCCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21R79 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:31)

55 ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
 GTTCAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
 TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCACCA
 GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAACTATAAC
 60 CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAATG
 GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
 TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGCAGTGTCTTCTGCATCC
 ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCTTGTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT

ES 2 938 628 T3

5 GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAACTTACACC
10 TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCTCTGCACCTCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTGCAG
15 GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
20 AACGGACAGCCGGAGAACAATAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTGTACTCCGAAGTACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGACACAATCACTACACTCAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCTGGCAAGTAG

25 **Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 219R45 (13A Versión 1) (SEQ ID NO:32)**

ATGAAGCATCTGTGGTTTTTCTGTGCTCGTGGCGGCACCCAGATGGGTGTTGTCCCAA
30 GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTATCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCTCCG
GGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATATAAG
GAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTACATG
40 GAACTTTCGTGCTGAGGTCCGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTATGAT
GACAAGTATTACCTCTGATGGATTATTGGGGTACGGGTACGTTGGTCACCGTCTCCAGC
35 GCGTCGACGAAAGGTCCTCGGTATTTCCCTCGCCCCCTGCTCGAGGTGACATCCGAA
TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCGGTAACGGTGTG
TGGAACTCGGGAGCGCTTACGTCCGGAGTCCACACATTTCCGGCGGTACTGCAATCCTCG
GGACTGTATTTCGTTGTCGTCAGTGGTACTGTCCCCTCCTCCAATTTCCGGACTCAGACC
40 TATACGTGCAACGTGACCACAAACCCTCAAACACCAAGGTGGATAAGACAGTGGAGCGC
AAGTGTGCGTGGAGTGTCCCCGTGTCCGGCACCCCCTGTCGCCGGACCCTCAGTCTTT
TTGTTTCCGCCGAAGCCCAAAGATACTCATGATCTCAAGAACGCCCGAGGTAACATGC
GTGGTGGTCGATGTAAGCCACGAGGATCCAGAAGTACAATTCAATTGGTATGTAGACGGG
45 GTCGAGGTCCATAACGCAAAGACGAAACCGAGGGAAGAGCAGTTCAATTGACTTTCCGG
GTGGTGTGCGTGCTTACAGTCTACATCAGGACTGGTTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGT
AAAGTATCGAATAAGGGCCTTCCAGCGCCGATTGAAAAGACCATCTCCAAGACCAAAGGA
CAGCCACGAGAGCCGCAAGTCTATACGCTTCTCCAGCCGAGAAAAGATGACTAAAAAC
50 CAGGTATCGCTTACGTGTCTCGTCAAGGGTTTCTACCCTTCGACATCGCGGTGGAATGG
GAGAGCAATGGACAACCGGAAAACAATAAGACGACACCGCCTATGTTGAAAAGCGAT
GGATCGTTTTTCTCTATTTCGAAACTCACGGTCGATAAGTACGGTGGCAGCAGGGGAAT
GTGTTCTCCTGTTGAGTGTGCACGAGGCGCTCCACAATCACTATAACCCAGAAAAGCCTG
55 TCACTTTCCCGGGAAAATGA

60

65

ES 2 938 628 T3

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 219R45 (13A Versión 2) (SEQ ID NO:33)

5 ATGAAGCACCTCTGGTTCTTCCTGCTCCTCGTGGCTGCTCCTCGGTGGGTCTCTCCCAA
 GTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTCTCC
 TGTAAGGCTTCCGGATACACCTTTACCAACTATTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCT
 10 GGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTACAAG
 GAAAAATTCAAACGGCGGGTCAACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTACATG
 GAACTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTACGAC
 GACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGTGTCCAGC
 GCTTCCACAAAAGGACCCTCCGTCTTTCCCTCGCCCCCTGCTCCCGGTCCACATCCGAA
 TCAACAGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCAGAGCCTGTACAGTGTCC
 15 TGGAATCCGGAGCTCTCACATCCGGAGTCCACACATTTCCCTGCTGTGCTCCAATCCTCC
 GGACTGTATTCCCTCTCCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAATTTCCGGACACAGACC
 TATACATGCAACGTGGACCACAAACCCTCCAACACCAAAGTCGATAAGACAGTGGAGCGC
 AAGTGTGCGTGGAGTGTCCCCCTTGTCTGCTCCCCCTGTGGCTGGACCTTCCGTCTTT
 CTGTTTCTCCTAAACCTAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGC
 20 GTGGTCGTGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCCAATTTAATTGGTATGTGGACGGG
 GTGGAGGTCCATAACGCTAAGACCAAACCTAGGGAAGAGCAGTTCAATTTCCACTTTCCGG
 GTGGTGTCCGTGCTGACCGTCGTTTATCAGGACTGGCTCAACGGGAAAGAATACAAATGC
 AAAGTCTCTAATAAGGGCCTCCCTGCTCCTATTGAAAAACAATTTCCAAAACAAAAGGA
 CAACCTCGGGAGCCTCAAGTCTACACACTGCCACCTTCCCGGAAAAAATGACAAAAAAT
 25 CAAGTCTCCCTCACATGTCTCGTCAAGGGATTCTACCCTTCCGACATTGCTGTGGAATGG
 GAATCCAATGGACAACCTGAAAACAACACTACAAGACAACACCTCCTATGCTCAAAGCGAT
 GGGTCTTTTTTCTCTATTCCAAACTCACAGTCGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGGAAT
 30 GTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAATCACTATAACCCAGAAAAGCCTG
 TCCCTCTCCCCTGGAAAATGA

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera (SEQ ID NO:34)

35 ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
 GACATCGTGATGACCCAGTCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
 ATCTCTTGAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
 CAGCAGAAGCCCAGGACCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCAGGGATCT
 40 GCGGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
 TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
 ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTT
 ATCTTCCCACCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTGCTGTGCCTGCTG
 45 AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC
 GGCAACTCCCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC
 TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG
 ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGTTAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21M18 (SEQ ID NO:35)

50 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
 TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCCTTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
 55 CCTGGGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCTCCTACAACGGCGCCACCAACTAC
 AACAGAAATTCAAGGGCCGCTGACCTTACCACCGACACCTCCACCTCCACCGCCTAC
 ATGGAAGTGCCTGCGGAGCGACACCGCCGTGACTACTGCGCCAGAGACTAC
 GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCCGTGTCTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 (13B) (SEQ ID NO:36)

60 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
 TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCCTTACTACATCCACTGGGTGAAACAGGCA
 65 CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTATATCGCCAACACTACAACCGGGCCACCAACTAC
 AACAGAAATTCAAGGGCCGCTGACCTTACCACCGACACCTCCACCTCCACAGCCTAC

ES 2 938 628 T3

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:37)

5 CAGGTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTAATTATAATAGAGCTACAACTAT
AACC AAAAATCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACTGACACCTCAACCTCGACAGCATAC
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
10 GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 (13A versión 1) (SEQ ID NO:38)

15 CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCAAGCGTAAAAGTA
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACACGTTTACAACTACTGGATGCATTGGGTGCGGCAGGCT
CCGGGACAGGGGTTGGAATGGATGGGTGACATTAACCCCTCAAATGGCAGAACATCATAT
AAGGAAAAGTTCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCAAGCTCGACTGCGTAC
ATGGAACTTTCGTCGCTGAGGTCCGAGGACACGGCAGTGTACTTTTGCACCATCCATTAT
20 GATGACAAGTATTACCCTCTGATGGATTATTGGGGT CAGGGTACGTGGT CACCGTCTCC
AGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 (13A Versión 2) (SEQ ID NO:39)

25 CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGGGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTTCCGTCAAAGTC
TCCTGTAAGGCCTCCGGATACACCTTTACCACTATTGGATGCCTGGGTGCGGCAGGCT
CCTGGACAAGGGCTGGAATGGATGGGAGACATCAATCCTTCCAATGGCAGAACCTCCTAC
AAGGAAAATCAAACGCCGCGTCACACTCTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACAGCTTAC
30 ATGGAACTTCTCCTCCCTGCGGTCCGAAGACACAGCTGTCTACTTCTGCACCATCCACTAC
GACGACAAGTACTACCCTCTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGGT CACCGTGTCC
AGC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:40)

35 GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAGCGGGCCACC
ATCTCTTGAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACACTACGGCATCTCCTTCATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCAACCAGGGATCT
GGCGTGCCCGACCGGTTCTCTGGATCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC
40 TCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGG
ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAG

Región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO:41)

45 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
50 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG2 humana (SEQ ID NO:42)

55 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
60 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
V FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena pesada de IgG3 humana (SEQ ID NO:43)

65

ES 2 938 628 T3

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVME
ALHNRFTQKSLSLSPGK

5

Región constante de cadena pesada de IgG4 humana (SEQ ID NO:44)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

10

15

Péptido FLAG (SEQ ID NO:45)

DYKDDDDK

20

Cadena pesada 21R79 parenteral con cadena no modificada de secuencia señal subrayada (SEQ ID NO:46)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIANYNRATNYNQFKGRVTF TTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKRC
CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQ
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

35

Cadena pesada de 219R45 parenteral con secuencia señal subrayada (SEQ ID NO:47)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF TNYWMHWVRQAP
GQGLEWMDINP SNGRTSYKEKFKRRVTLSDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYFCTIHYD
DKYYPLMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVK
KCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
GDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

45

Cadena pesada 21R79 parenteral sin secuencia señal predicha (SEQ ID NO:48)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQFKGRVTF TTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD YDVGMDYWGQGT LVT VSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKRC CVECPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

50

55

60

Cadena pesada 21R45 sin secuencia señal (SEQ ID NO:49)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF TNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINP SNGRTSY
KEKFKRRVTLSDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGT LVT VSS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

65

ES 2 938 628 T3

SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
5 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R79 parenteral (SEQ ID NO:50)

10 CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATC
TCGTGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCG
CCAGGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTAT
15 AACCAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCAACGATAACATCGACATCGACGGCCTAC
ATGGAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTAC
GACTATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 219R45 parenteral (SEQ ID NO:51)

20 CAGGTACAGCTCGTGCATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCCGTTAAAGGTC
AGCTGCAAAGCGTCAGGTTATACATTACGAATTACTGGATGCATTGGGTGAGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTAT
25 AAGGAGAAGTTTAAAGAGGCGGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCTCAACGGCCTAC
ATGGAGTTGTCATCCCTGCGGTGCGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTAT
GACGATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACATTGGTAACCGTGAGC
AGC

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R79 parenteral (SEQ ID NO:52)

30 ATGAAACACTTGTGGTTTTTCTCTTGCTCGTGGCAGCTCCTCGGTGGGTACTTTTACAA
GTGCAGCTCGTGCAGTCAGGGGCGGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCATCGGTCAAAATCTCG
TGTAAGGCCTCGGGGTACTCCTTTACTGCGTATTACATCCATTGGGTAAAGCAGGCGCCA
35 GGGCAGGGATTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCAATTACAATCGCGCGACGAACTATAAC
CAGAAATTCAAGGGAAGGGTGACCTTCAACGATAACATCGACATCGACGGCCTACATG
GAACTTCGCAGCCTGCGATCAGATGACACGGCGGTATACTATTGCGCAAGAGATTACGAC
TATGATGTGGGAATGGACTATTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCACAGTCTCCTCCGCCAGC
40 ACCAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAC
TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC
45 TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGT
TGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTCTC
CCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
50 GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTC
AGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
55 AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAA

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 219R45 parenteral (SEQ ID NO:53)

60 ATGAAACACCTCTGGTTCTTTTTGCTCCTGGTGGCAGCTCCCCGATGGGTGCTTAGCCAG
GTACAGCTCGTGCATCGGGGGCAGAGGTCAAAAAGCCCGGTGCGTCCGTTAAAGGTCAGC
65 TGCAAAGCGTCAGGTTATACATTACGAATTACTGGATGCATTGGGTGAGACAGGCCCT
GGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAGATATCAATCCGTCGAACGGACGGACTAGCTATAAG

GAGAAGTTTAAAGAGGCGCGTAACACTGTCGGTGGACAAATCGTCCTCAACGGCCTACATG
GAGTTGTCATCCCTGCGGTGCGGAAGATACGGCGGTCTACTTCTGTACTATCCACTATGAC
GATAAGTACTACCCGCTTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACATTGGTAACCGTGAGCAGC
5 GCGTCCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTG
TGGAAGTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCA
GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
10 TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
15 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
GTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGACACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
20 CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
25 TCCCTGTCTCCGGGTAAA

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera 21R79 y 219R45 parenteral (SEQ ID NO:54)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC
30 CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC
GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTACCCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG
ACATTCCGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera 21R79 y 219R45 parenteral (SEQ ID NO:55)

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGG
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACC
40 ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTC
CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCTGCATCCAACCAAGGGTCC
GGGGTCCCTGACAGGTTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTACCCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTCAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGG
45 ACATTCCGAGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCCCTCCGTCTTC
ATCTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAAAGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCCGGGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAAGC
GGCAACTCCCAGGAGAGCGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
50 AGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTGA

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R75 (SEQ IDNO:56)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFL
60 FPPKPKDITLMSRTPQVTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal predicha 21R75 (subrayada) (SEQ ID NO:57)

5 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
GQGLEWIGYIAGYKDATNYNQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
YDVGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRC
10 CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTIISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región variable de cadena pesada 21R75 (SEQ ID NO:58)

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSS

CDR2 de cadena pesada 21R75 (SEQ ID NO:59)

20 YIAGYKDATNYNQKFKG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:60)

25 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCAGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCT
GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
30 CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAAGTGCAGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTTCTCTGGCCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC
35 TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCTCCGTGCTGACTGTGCCCTCCTCCAACCTCGGCACCCAGACCTACACC
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAACGGAAGTGC
TGCGTGAATGCCCCCTTGCTCTGCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTCTCTGTTC
40 CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTG
45 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
50 TTCTTCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
TCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión 1T) (SEQ ID NO:77)

55 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCAGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCT
60 GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTACAAC
CAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTACCACCGACACCTCCACCTCTACCGCCTACATG
GAAGTGCAGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC

65

ES 2 938 628 T3

TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCC
ACCAAGGGCCCTCCGTGTTTCTCTGGCCCTTGTCTCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAA
5 TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG
TACTCCCTGTCTCCGTGACTGTGCCCTCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACC

TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAAACGGAAGTGC
10 TGCGTGGAATGCCCCCTTGTCCTGCCCTCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTCTCTGTTT
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
15 TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAAATGGGAGTCC
AACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
20 TTCTTCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 (13B Versión S1-2) (SEQ ID NO:61)

25 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
GTTTACAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
30 TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATACATG
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
35 TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTCCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAACTTACACC
40 TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCTGACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTCTGTTT
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCCTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
45 GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
50 AACGGACAGCCGGAGAACAATAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAGTCCCTATCTTA
TCTCTGGCAAG

Cadena pesada sin secuencia señal predicha 21R83 (SEQ ID NO:62)

60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
65 VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Cadena pesada con secuencia señal predicha 21R83 (subrayada) (SEQ ID NO:63)

5 MKHLWFFLLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP
 GQGLEWIGYISNYNRATNYNQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYD
 YDVGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

10 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKC
 CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGGS
 FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 Región variable de cadena pesada 21R83 (SEQ ID NO:64)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
 NQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS

20 CDR2 de cadena pesada 21R83 (SEQ ID NO:65)

YISNYNRATNYNQKFKG

25 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 1) (SEQ ID NO:66)

30 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
 GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
 TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCT
 GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC
 CAGAAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG
 GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
 TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC
 35 ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCTCTGGCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
 GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAC
 TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG
 TACTCCCTGTCTCCGTGCTGACTGTGCCCTCCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACC
 40 TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAAACGGAAAGTGC
 TGCGTGGAATGCCCCCTTGTCCTGCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
 GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
 45 GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
 TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTG
 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
 CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAAGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
 50 AACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
 TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
 AGCCCCGCAAG

55 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 1T) (SEQ ID NO:78)

60 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTCAG
 GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC
 TGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCCCT
 GGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACACTACAACCGGGCCACCAATTACAAC

65

ES 2 938 628 T3

5 CAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCTTCACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTACATG
 GAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGAC
 TACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGCGCTTCC
 10 ACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC
 GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGACAGTGTCTGGAAC
 TCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTG
 TACTCCCTGTCTCCGTGACTGTGCCCTCCTCCAACCTCGGCACCCAGACCTACACC
 15 TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCCGTGGAACGGAAGTGC
 TGCGTGGAATGCCCCCTTGTCTGCCCCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTT
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG
 GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA
 20 GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTG
 TCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTG
 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGACAGCCC
 CGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
 25 AACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCTGTACAGCGAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT
 TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCCTACACCAGAAGTCCCTGTCCCTG
 AGCCCCGCAAG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 subrayada (13B Versión S1-2) (SEQ ID NO:67)

30 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCCCAG
 GTTCAGCTAGTTTCACTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
 TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTTACCCGATACTATATCCACTGGGTTAAACAGGCACCA
 35 GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
 CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATAATG
 GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
 TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGCAGTGTCTTCTGCATCC
 ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCCTTGTCTCTGTTTCGACCTCTGAATCGACT
 40 GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCCTTCTGGAAC
 TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
 TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAAACTTACACC
 TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
 TGCGTTGAGTGCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTTCTGTTT
 45 CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCCTGGTT
 GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCCGAG
 GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
 TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGAAGGTG
 50 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
 CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
 AACGGACAGCCGGAGAACAACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
 TTCTTCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT
 55 TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAGTCCCTATCCTTA
 TCTCCTGGCAAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:68)

60 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
 TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCAGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
 CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTATATCGCCGGCTACAAGGACGCCACCAACTAC
 AACCAGAAATTCAAGGGCAGAGTGACCTTACCACCGACACCTCCACCTTACCAGCCTAC
 65 ATGGAAGTGCAGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
 GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCT

ES 2 938 628 T3

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:69)

5 CAGGTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATA
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT

10 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R83 (13B Versión 1) (SEQ ID NO:70)

15 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
TCTGCAAGGCCCTCCGGTACTCCTTCACCGCCTACTACATCCACTGGGTCAAGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTCCAACCTACAACCGGGCCACCAATTAC
AACAGAAATTCAAAGGGCCGCGTGACCTTACCACCGACACCTCTACCTCTACCGCCTAC
ATGGAACTGCGGTCCCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTAC
GACTACGACGTGGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTAGC

20 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R75 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:71)

25 CAGGTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAACTAT
AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATA
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

30 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R83 subrayada (13B Versión 2) (SEQ ID NO:72)

35 ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATA
40 GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTCCCTTTGGCCCTTGCTCTCGTTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTTCTGGAAC
45 TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCTGACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTCTGTT
50 CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTTCGTGGTT
GTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
55 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACCTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
60 TTCTTCTGTACTCCGAACCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCTGGCAAGTAG

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada 21R83 (13B Versión 2) (SEQ ID NO:73)

65

ES 2 938 628 T3

CAGGTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATA
AGTTGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCA
CCAGGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCAATTATAATAGAGCTACAAACTAT
5 AACCAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATA
ATGGAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTACTATTGCGCTAGAGATTAT
GATTATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

10 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada con secuencia señal 21R75 subrayada (13B Versión 2) (SEQ ID NO:74)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
GTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
15 TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCGCTGGATATAAAGATGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATA
GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
20 TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCTGGAAC
TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAACTTACACC
25 TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTGTTC
CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
30 GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG
35 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAAC TACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCCTGTACTCCGAAC TACCGTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAGTCCCTATCCTTA
40 TCTCCTGGCAAGTAG

40 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 21M18 (versión 2) (SEQ ID NO:75)

ATGAAGCACCTATGGTTCTTTCTATTATTAGTGGCCGCTCCCCGTTGGGTGTTATCGCAG
45 GTT CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGT
TGCAAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCACCA
GGACAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAAACTATAAC
CAAAAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATA
50 GAATTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGAT
TATGATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCATCC
ACTAAGGGACCATCCGTGTTCCCTTTGGCCCCTTGCTCTCGTTCGACCTCTGAATCGACT
GCCGCTCTGGGATGCCTCGTGAAAGATTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTTTCTGGAAC
55 TCGGGCGCCCTAACCTCTGGCGTGACACATTCCCTGCCGTGCTACAGTCTTCTGGCCTA
TACTCTTTATCTTCGGTTGTTACCGTACCTTCTTCTAACTTCGGAACCCAACTTACACC
TGTAACGTAGACCACAAGCCTTCGAACACCAAGGTGGACAAGACTGTTGAGCGAAAGTGC
TGCGTTGAGTGCCCTCCATGTCCTGCACCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCTGTTC
60 CCTCCAAAACCTAAGGACACTCTAATGATCTCTCGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTGGTT
GTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTCGAG
GTGCACAATGCAAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTT
TCTGTGTTGACCGTTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTG
65 TCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCT
CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTG

ES 2 938 628 T3

5 TCCCTGACCTGTCTGGTGGAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGTTGAGTGGGAGTCT
AACGGACAGCCGGAGAACAACACTACAAGACTACGCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTGTACTCCGAACTGACCGTGGACAAGTCCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTT
TCATGCTCCGTAATGCACGAAGCCTTGCACAATCACTACACTCAAAGTCCCTATCCTTA
TCTCCTGGCAAGTAG

Región variable de cadena pesada 21M18 (versión 2) (SEQ ID NO:76)

10 CAGCTAGTTCAGTCTGGAGCGGAAGTTAAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAATAAGTTGC
AAGGCATCCGGTTACTCGTTCACCGCATACTATATCCACTGGGTAAACAGGCACCAGGA
CAGGGACTTGAATGGATCGGATATATCTCCTCTTATAATGGAGCTACAACTATAACCAA
15 AAATTCAAAGGACGCGTGACTTTCACAACCTGACACCTCAACCTCGACAGCATAACATGGAA
TTACGGTCCCTACGGTCTGACGACACTGCCGTTTACTATTGCGCTAGAGATTATGATTAT
GATGTTGGAATGGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

20 Secuencia consenso de cadena pesada CDR2 de cadena pesada Anti-DLL4 (SEQ ID NO:80):
YIX1X2YX3X4ATNYNQKFKG, donde Xi es serina o alanina, X2 es serina, asparagina, o glicina, X3 es asparagina
o lisina, y X4 es glicina, arginina, o ácido aspártico.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 5 a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y
 b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humana,
- en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO: 17), una cadena pesada CDR2 que comprende DINPSNGRSTSYKEKFKR (SEQ ID NO: 18) y una cadena pesada CDR3 que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO: 19);
- 10 en el que el segundo sitio de unión al antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 13), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO: 80), donde X₁ es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina o ácido aspártico y una cadena pesada CDR3 que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO: 16); y
- 15 en el que tanto el primer como el segundo sitio de unión al antígeno comprenden una cadena ligera CDR1 que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO: 20), una cadena ligera CDR2 que comprende AASNQGS (SEQ ID NO: 21) y una cadena ligera CDR2 que comprende AASNQGS (SEQ ID NO: 21) cadena CDR3 que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO: 22); y
- 20 en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG.

2. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende:

- 25 (a) una primera región variable de cadena pesada que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:11;
 (b) una segunda región variable de cadena pesada que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:64; y
 (c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:12.
- 30

3. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 7, una cadena pesada de SEQ ID NO: 62 y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO: 8.

- 35 4. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF humano y DLL4 humano, que comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33, una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 72 y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 34.

40 5. El anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo sitio de unión a antígeno se une a un fragmento N-terminal de DLL4 humano (aminoácidos 1-191 de SEQ ID NO: 24).

45 6. El anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo sitio de unión a antígeno se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 40-47 y/o los aminoácidos 113-120 de SEQ ID NO:25.

7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el primer sitio de unión a antígeno se une a VEGF humano con una K_D de aproximadamente 100 nM o menos y el segundo sitio de unión a antígeno se une a DLL4 humana con una K_D de aproximadamente 100 nM o menos.

50 8. Una célula que comprende o produce el anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Una molécula polinucleotídica aislada que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector que comprende dicho polinucleótido aislado o una célula que comprende dicho polinucleótido aislado o dicho vector.

55 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 11. Un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usar en un método para modular la angiogénesis en un sujeto, inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor en un sujeto o tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico.

65 12. Un anticuerpo biespecífico para su uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer o tumor se selecciona del grupo que consiste en cáncer o tumor colorrectal, cáncer o tumor de colon, cáncer o tumor de ovario, cáncer o tumor de páncreas, cáncer o tumor de pulmón, cáncer o tumor de hígado, cáncer o tumor de mama, cáncer o tumor de riñón,

cáncer o tumor de próstata, cáncer o tumor gastrointestinal, melanoma, cáncer o tumor de cuello uterino, cáncer o tumor de vejiga, glioblastoma y cáncer o tumor de cabeza y cuello.

5 13. Un anticuerpo biespecífico para su uso según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que además comprende administrar un segundo agente terapéutico, opcionalmente un agente quimioterapéutico o un segundo anticuerpo.

10 14. Una composición farmacéutica para usar en un método para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, en la que la composición farmacéutica comprende un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF humano y DLL4 humana, que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 7, una cadena pesada de SEQ ID NO: 62 y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO: 8, y un vehículo farmacéutico.

Figura 1A

Anticuerpo biespecífico	Región de unión a anti-VEGF				Región de unión a anti-DLL4			
	Cadena Pesada				Cadena Pesada			
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR3
219R45-MB-21M18	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:15)	RDYDYDVGM DY (SEQ ID NO:16)		
219R45-MB-21R79	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:14)	RDYDYDVGM DY (SEQ ID NO:16)		
219R45-MB-21R75	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:59)	RDYDYDVGM DY (SEQ ID NO:16)		
219R45-MB-21R83	NYWMH (SEQ ID NO:17)	DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:18)	HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:19)	TAYYIH (SEQ ID NO:13)	YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:65)	RDYDYDVGM DY (SEQ ID NO:16)		

Anticuerpo biespecífico	Regiones de unión a anti-VEGF y anti-DLL4			
	Cadena Ligera			
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR3
219R45-MB-21M18	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R79	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R75	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)
219R45-MB-21R83	RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:20)	AASNQGS (SEQ ID NO:21)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)	QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:22)

Figura 1B

Anticuerpo biespecífico	Región de unión a anti-VEGF		Región de unión a anti-DLL4	
	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:12
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:12

Figura 1C

Anticuerpo biespecífico	Región de unión a anti-VEGF		Región de unión a anti-DLL4	
	Cadena Pesada	Cadena Ligera	Cadena Pesada	Cadena Ligera
219R45-MB-21M18	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:4
	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R79	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4
	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R75	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:4
	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:8
219R45-MB-21R83	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:4
	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:8

Figura 2

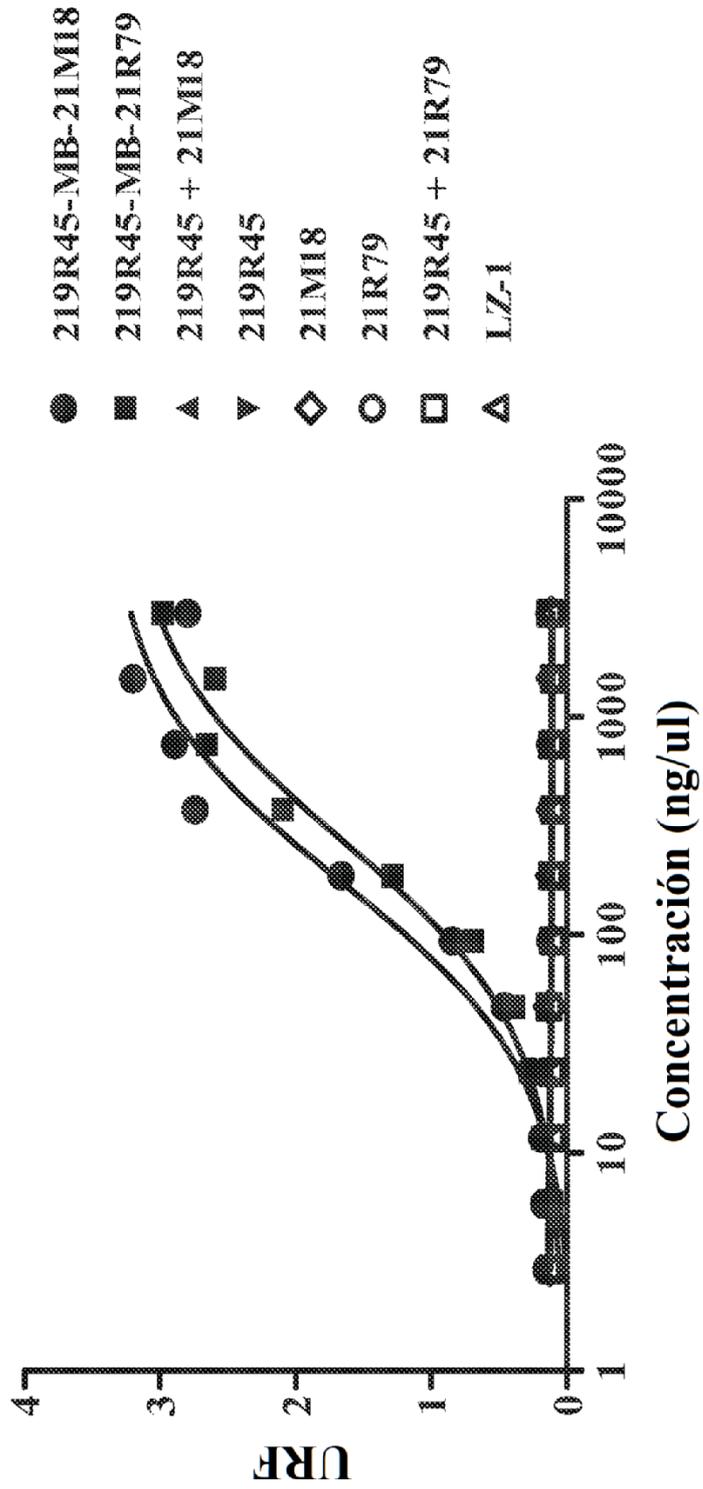


Figura 3

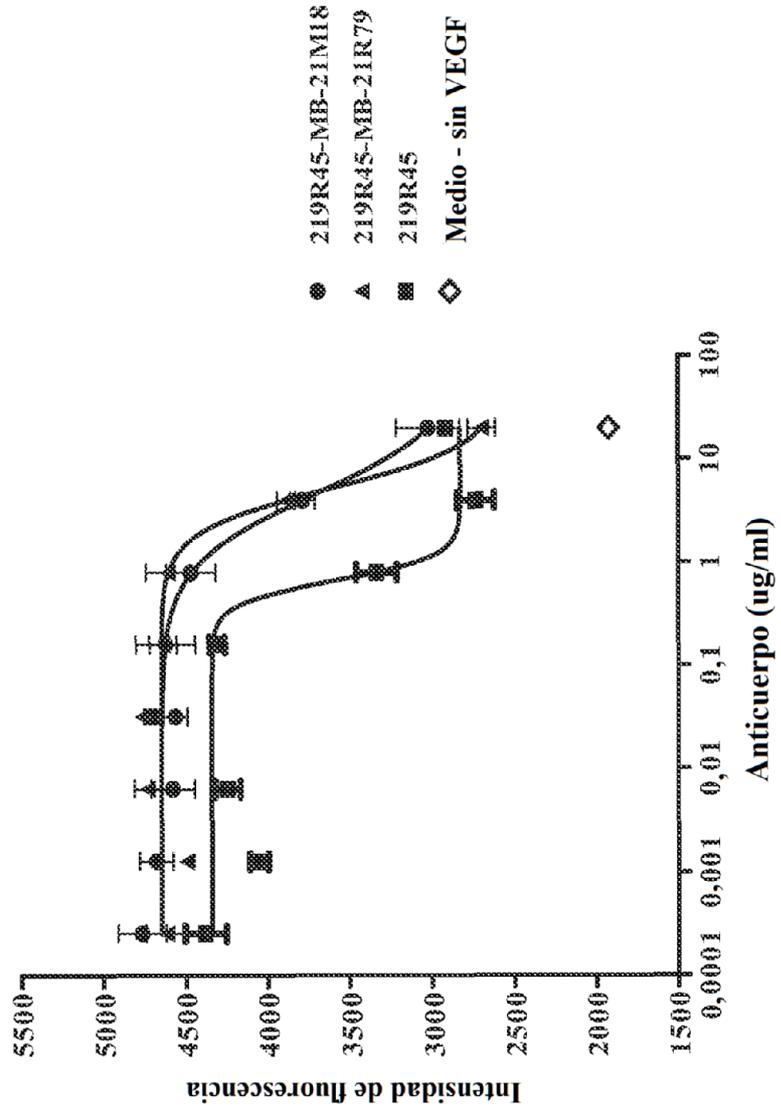


Figure 4

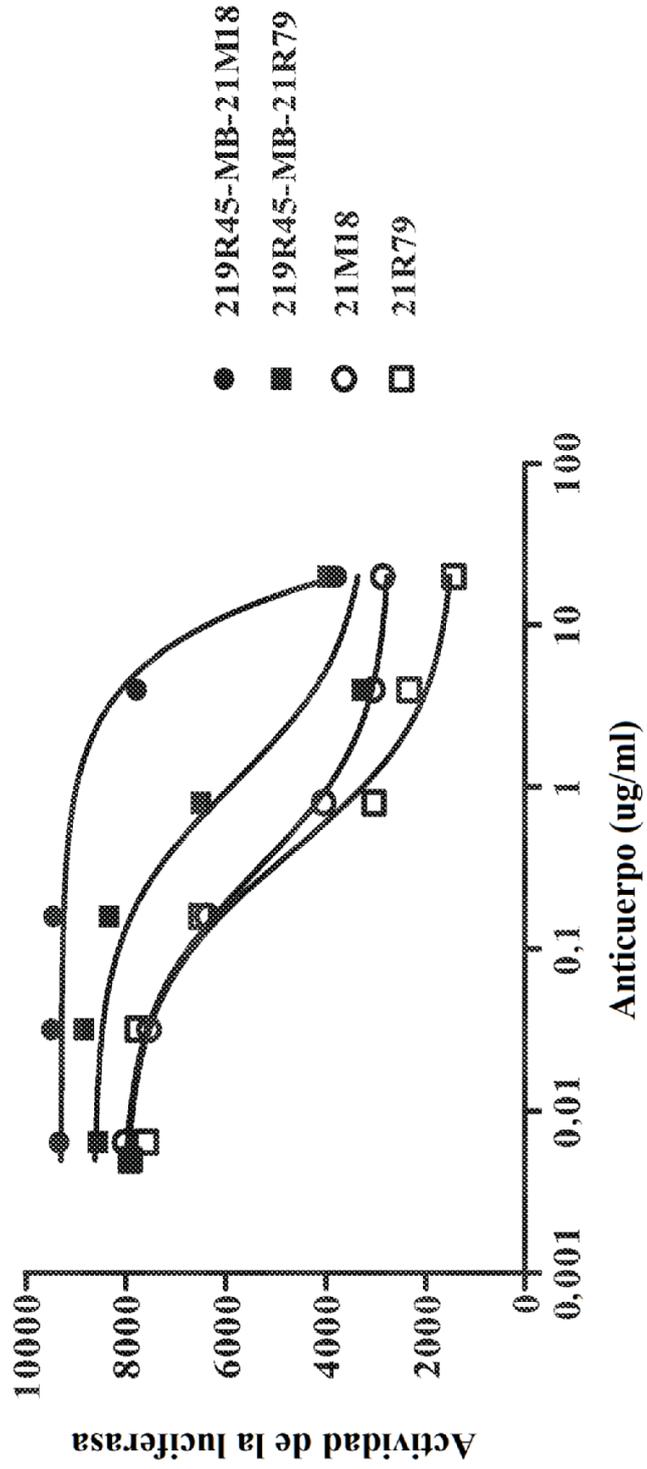


Figura 5

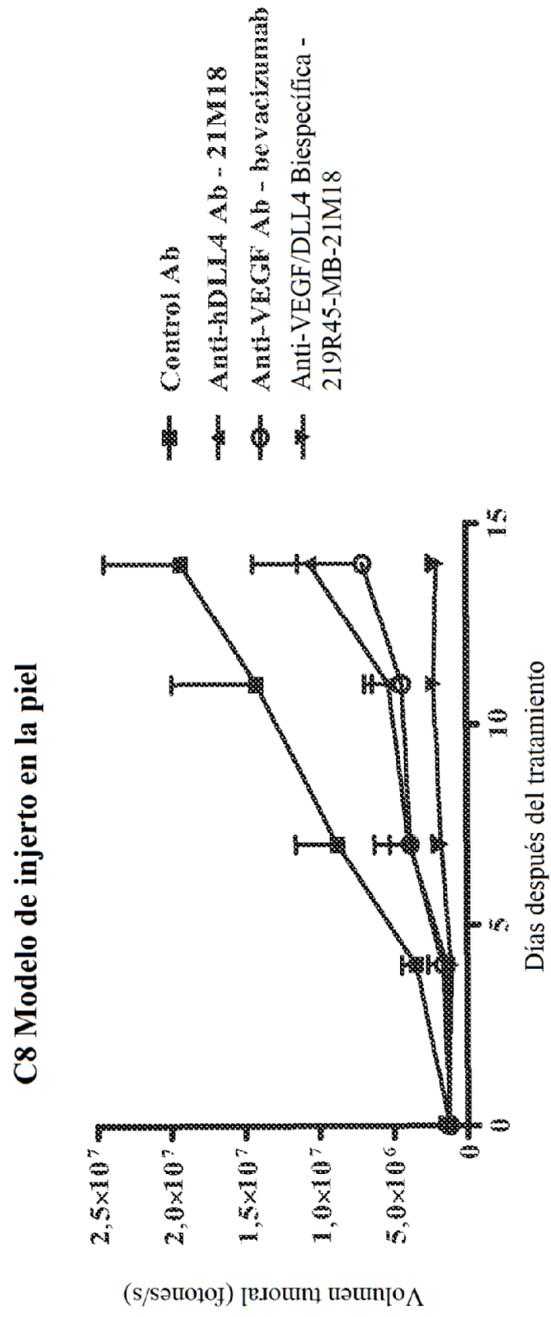


Figura 6

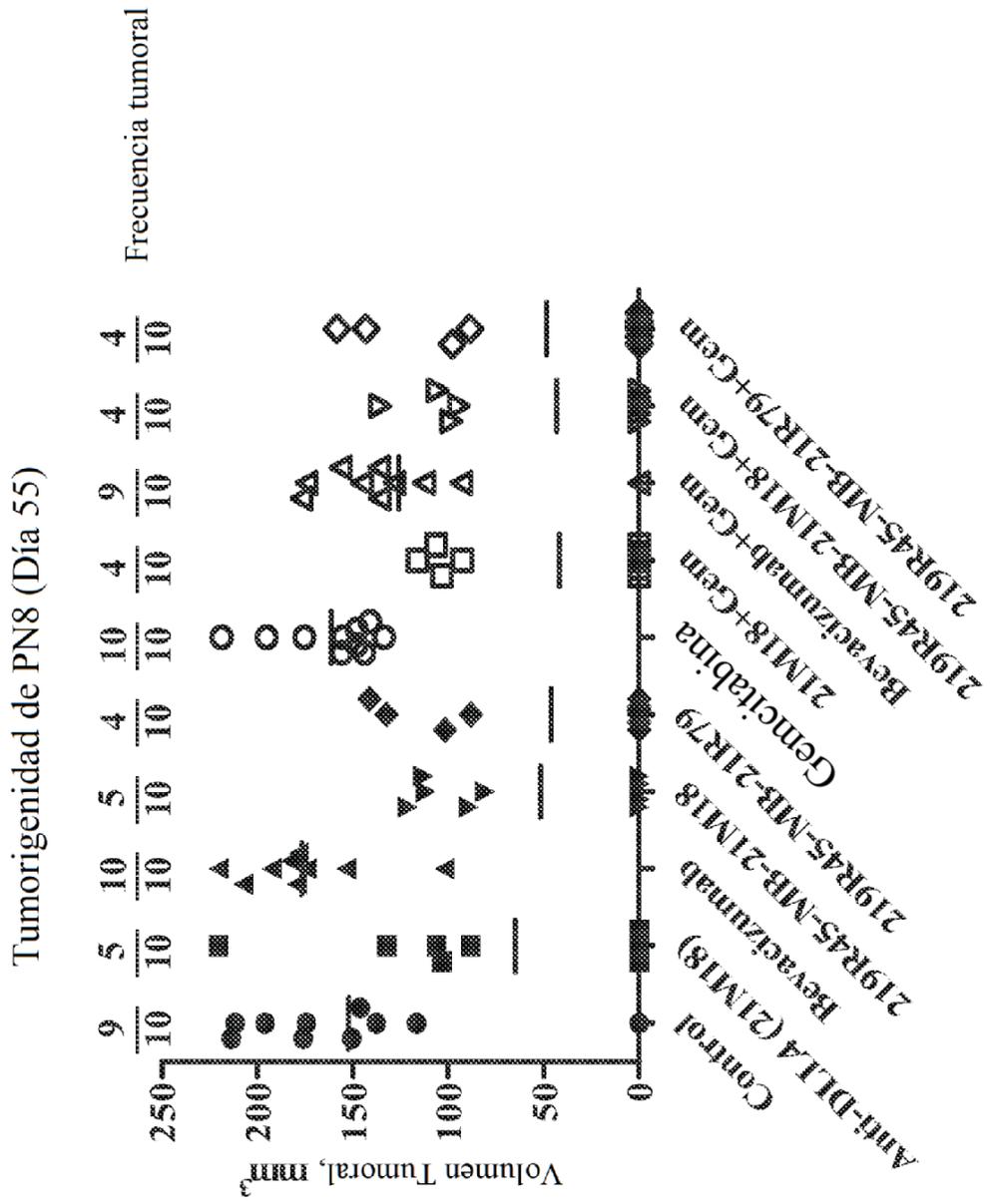


Figura 7

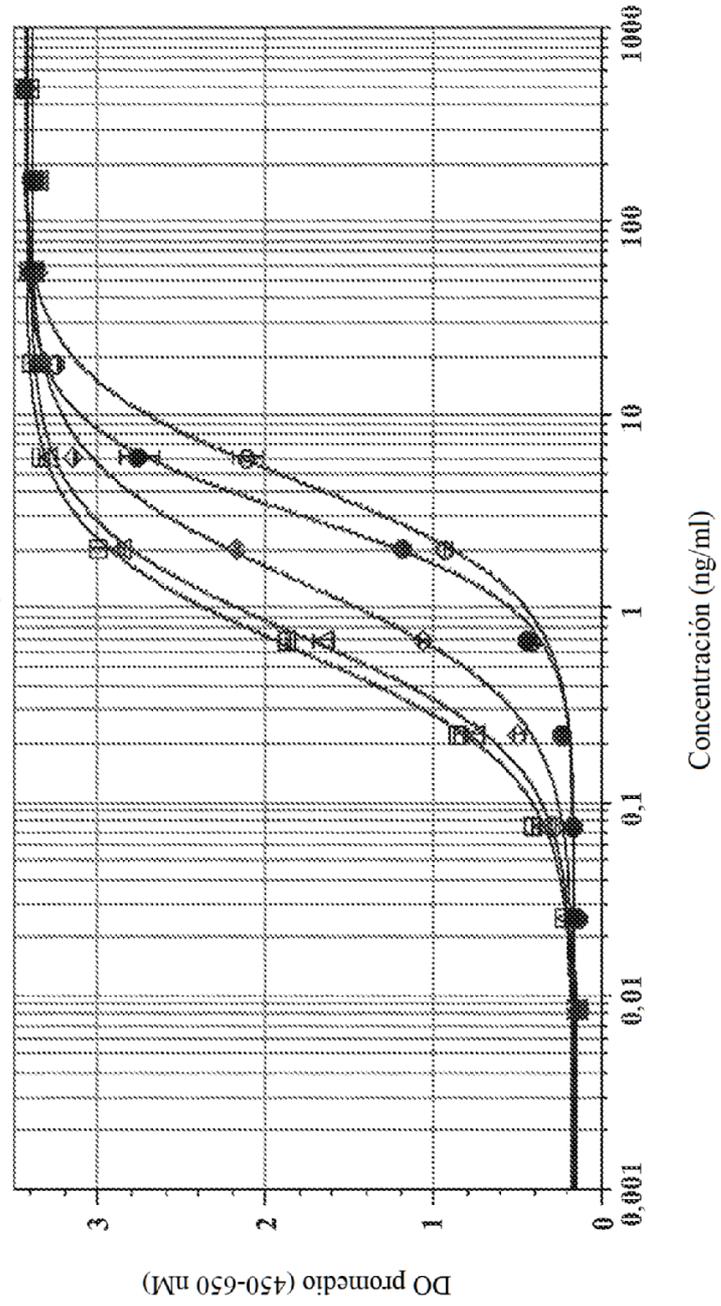


Figura 8

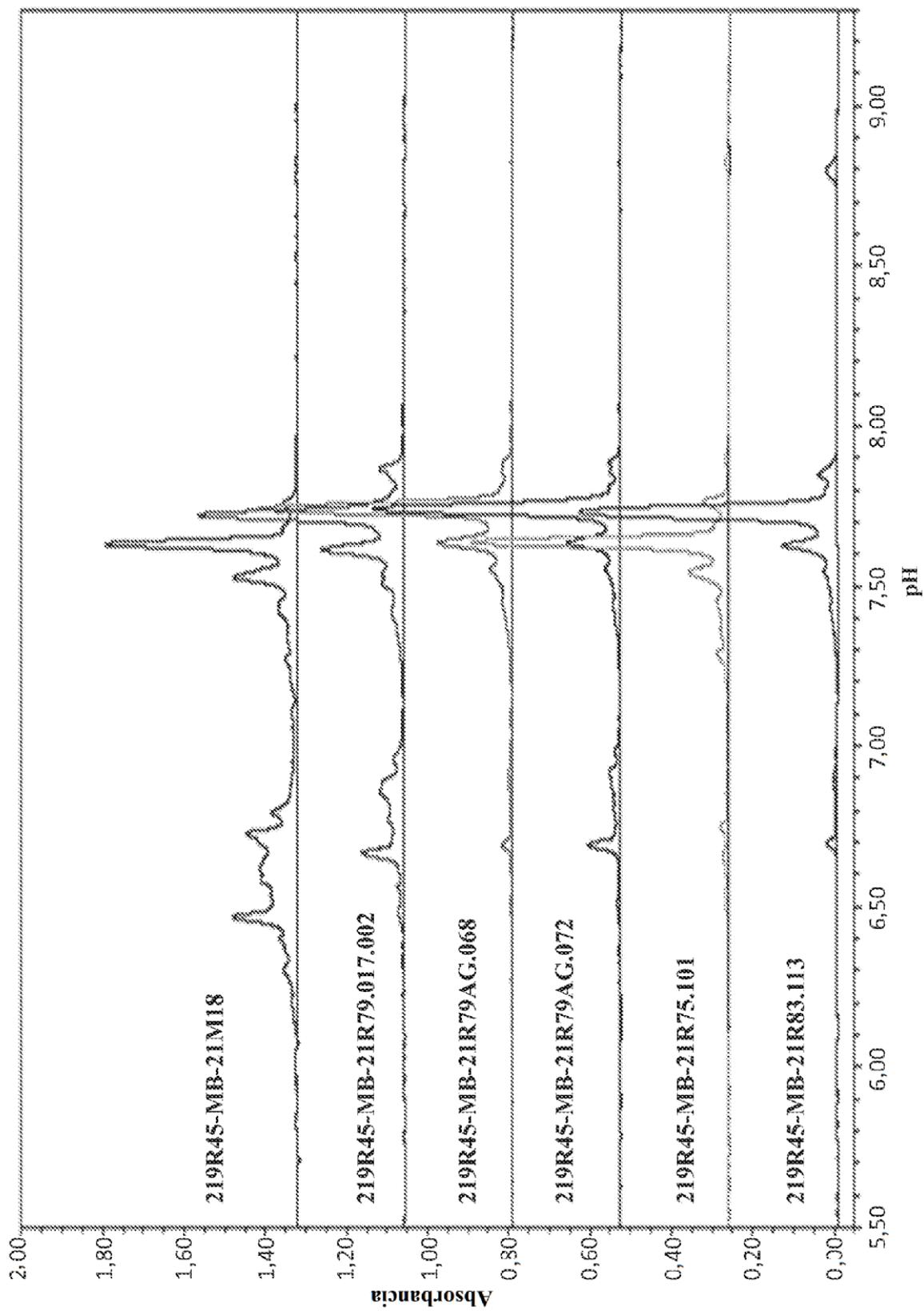


Figura 9

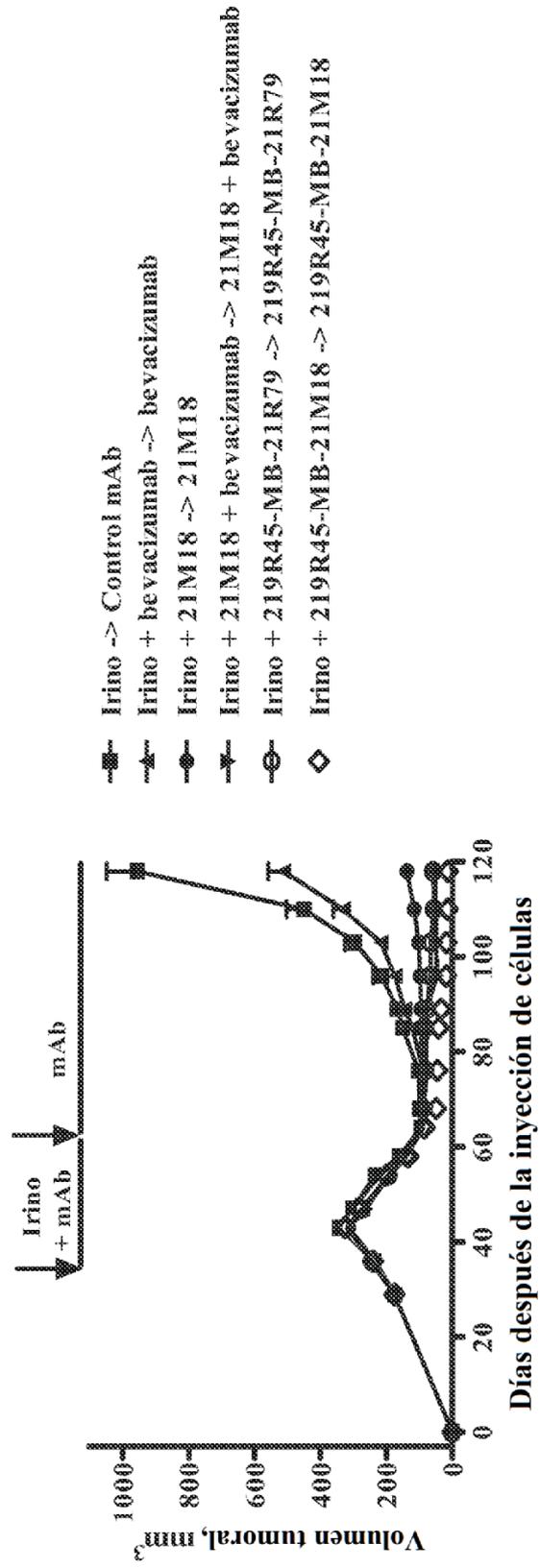


Figura 10

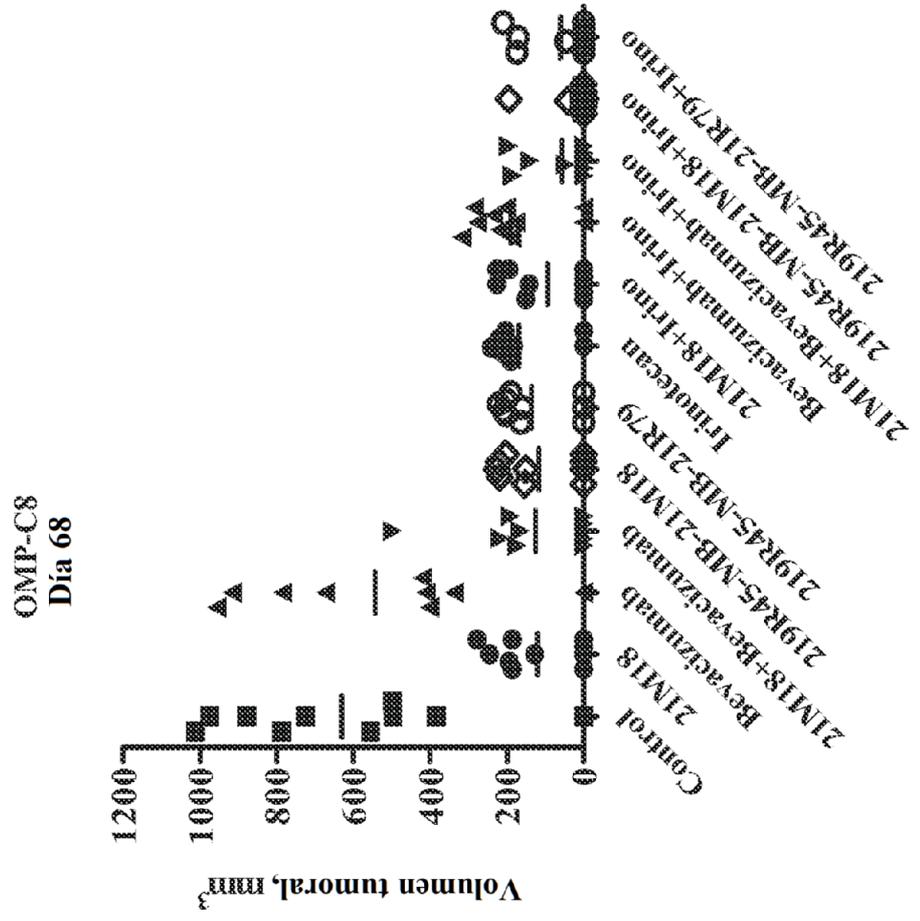


Figura 11

