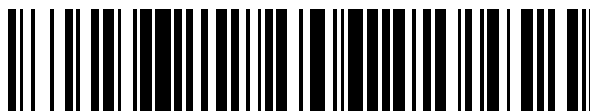


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 855**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2014** **PCT/KR2014/006090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15005632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2014** **E 14823338 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 3020731**

54 Título: **Nueva proteína de objetivo doble que se une específicamente a DLL4 y CEGF, y uso de la misma**

30 Prioridad:

09.07.2013 KR 20130080523

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

17.02.2020

73 Titular/es:

ABLBIO (100.0%)
146, Teheran-ro, Gangnam-gu
Seoul, 06236, KR

72 Inventor/es:

LEE, DONG HEON;
MOON, KYUNG DUK;
CHOI, YU BIN;
KANG, KYUNG JAE;
KIM, DONG IN;
AHN, JIN HYUNG;
YOU, WEON KYOO y
JUNG, JINWON

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 742 855 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

Nueva proteína de objetivo doble que se une específicamente a DLL4 y CEGF, y uso de la misma

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una nueva proteína de objetivo doble que comprende: una proteína que se une específicamente al ligando 4 tipo delta (DLL4) y un anticuerpo que se une específicamente al factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF).

10

ANTECEDENTES DE LA TECNICA

Se ha informado de que la señalización Notch es una evolución altamente conservada en animales vertebrados e invertebrados y desempeña un papel fundamental en la determinación del destino de las células en la etapa inicial de desarrollo. La señalización Notch se conoce como una vía principal que regula la diferenciación de células neurales, células intraoculares, linfocitos, células musculares, hematocitos y similares, y también está implicada en el desarrollo de los vasos sanguíneos. Los mamíferos tienen cuatro receptores Notch (Notch 1, 2, 3 y 4), y cada uno de los receptores Notch se sintetiza como una proteína que tiene un tamaño de 300-350 kDa y se escinde en el sitio S1 por convertasa similar a furina en el Golgi para formar un heterodímero en la superficie celular. Además, en los mamíferos se encontraron cuatro ligandos Notch (serrado-1/2 y ligando tipo delta (DLL) 1/3/4).

20

Se sabe que la señalización Notch activada induce la tumorigénesis en varios modelos de tumores. Cuando se expresó la NICD de Notch activada en células hematopoyéticas de rata, se produjeron leucemia/linfomas de células T y se encontró Notch 1 activado en aproximadamente el 50% de la T-ALL (leucemia linfoblástica aguda de células T). Además, en el caso del cáncer de mama, se descubrió que el receptor Notch 4 estaba sobreexpresado en ratas (Czech II) introducidas con MMTV (virus de tumor mamario de ratón), y se ha informado la aparición de un tumor de glándula mamaria en estas ratas. Se ha informado que los receptores y ligandos de Notch y los objetivos de señalización Notch se activan en varios tipos de cáncer como el cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama y cáncer de próstata. Se sabe que el receptor Notch 1 está asociado con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama y asociado con la metástasis del cáncer de próstata.

25

30

El ligando 4 tipo Delta (DLL4) (en lo sucesivo referido como "DLL4") es uno de los ligandos de clase delta que se unen a las proteínas Notch que se sobreexpresan en las células endoteliales vasculares. Es conocido como un factor principal que regula la angiogénesis. El DLL4 se une particularmente al receptor Notch 1 o Notch 4 que se sobreexpresa en las células endoteliales vasculares. Se sabe que el DLL4 está altamente sobreexpresado en los vasos sanguíneos con cáncer, aunque también se expresa en vasos sanguíneos normales. La angiogénesis se refiere al mecanismo mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes. En particular, en los tumores, la angiogénesis está provocada por factores angiogénicos como el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) para suministrar oxígeno y nutrientes al área de hipoxia del tejido canceroso. Se sabe que la angiogénesis en los tumores desempeña un papel importante no solo en el crecimiento del tumor, sino también en la metástasis del tumor. Cuando se bloquea la señalización Notch por DLL4 en los tumores, la angiogénesis no se puede controlar fácilmente y, por tanto se puede inhibir el crecimiento de los tumores. Además, cuando se inhibe la señalización Notch por el DLL4, la enfermedad autoinmune puede tratarse aumentando el número de células T reguladoras (Treg) (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2011-0189200). Por estas razones, el DLL4 se convierte en un nuevo objetivo en el tratamiento de cánceres y enfermedades autoinmunes.

35

40

45

Mientras tanto, como un fármaco de anticuerpos anticanceroso para inhibir la angiogénesis, el Avastin® (Genentech/Roche) que se dirige a VEGF fue aprobado por la FDA en 2004 y ha tenido un gran éxito como agente terapéutico anticanceroso. Sin embargo, estudios de modelos clínicos y de modelos de animales preclínicos recientes han indicado que todos los tumores sólidos no responden a los inhibidores de VEGF, y también se ha informado de una serie de casos en los que algunos tumores tratados con inhibidores de VEGF en la etapa inicial muestran resistencia después de un cierto tiempo. Además, se ha informado de resultados de estudios que indican que la administración de inhibidores de VEGF convierte las células cancerosas en células cancerosas que son más agresivas y se metastatizan fácilmente. Tales informes de estudios han impulsado la investigación y el desarrollo de nuevos objetivos anticancerosos que superan la resistencia a Avastin o que tienen una eficacia superior a la de Avastin. Entre tales nuevos objetivos anticancerosos, las proteínas que participan en la vía de señalización DLL4/Notch están atrayendo la atención. De acuerdo con los resultados del estudio informados hasta la fecha, se espera que, debido a que la vía de señalización VEGF/VEGFR y la vía de señalización DLL4/Notch influyen en la angiogénesis mediante diferentes mecanismos, pueden obtenerse efectos anticancerosos sinérgicos más fuertes cuando se inhiben las dos vías de señalización.

50

55

60

La WO 2014/007513 A1 divulga un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al ligando 4 de tipo delta humano (DLL4) para inhibir una interacción entre el ligando 4 del tipo delta humano (DLL4) y el receptor Notch.

65

La WO 2010/129304 A2 divulga un anticuerpo aislado que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), que 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).

La WO 2013/044215 A1 divulga un anticuerpo aislado que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), que 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). El documento también divulga anticuerpos biespecíficos contra DLL4.

La WO 2011/039370 A1 divulga una molécula de unión bi-específica que comprende un componente de unión a DLL4 y un componente de unión a VEGF.

La WO 2012/061374 A2 divulga una proteína de unión que se une a un par de antígenos, que comprende una cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada; C es un dominio constante de cadena pesada; X1 es un conector con la condición de que no sea CH1; X2 es una región Fc; (X1)_n es (X1)₀ o (X1)₁; y (X2)_n es (X2)₀ o (X2)₁; en donde el par de antígenos es TNF y PGE2 o VEGF y DLL4, y en donde el VD1 y el VD2 comprenden independientemente tres CDR de la SEQ ID NO: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, o 302.

La WO 2009/085209 A2 divulga una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo original o parte de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo original o parte de unión al antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)_n es un conector con la condición de que no sea CH1, en donde dicho (X1)_n está presente o ausente; y (X2)_n es una región Fc, en donde dicho (X2)_n está presente o ausente, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD20 y CD-40; CD3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR y IGF1,2; EGFR y IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 y IGF1,2; HER-2 y IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF y IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

La WO 2009/085209 A2 divulga un método para tratar el cáncer, el método comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad eficaz de un antagonista de DLL4.

La WO 2014/071074 A2 divulga una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada; C es un dominio constante de cadena pesada; X1 es un conector con la condición de que no sea CH1; X2 es una región Fc; n es 0 o 1; y en donde la proteína de unión se une a DLL4 y VEGF, en donde VD1 y VD2 comprenden independientemente tres CDR de la SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51 o 53, y en donde por lo menos uno de VD1 y/o VD2 comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 39.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMA TÉCNICO

Los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para desarrollar una proteína de objetivo doble que puede unirse específicamente a DLL4 y VEGF derivados de humanos para inhibir eficazmente las vías de señalización de DLL4/Notch y VEGF/VEGFR y puede minimizar el riesgo de inmunogenicidad. Como resultado, los presentes inventores han construido un nuevo anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a VEGF humano, que es una proteína de objetivo doble en la que un nuevo ScFv (fragmento variable de cadena sencilla) que se une específicamente al DLL4 humano está conectado a la región C-terminal de una proteína similar a Avastin tipo IgG, y han descubierto que dicha proteína de objetivo doble inhibe eficazmente no solo la interacción entre VEGF y el receptor de VEGF, sino también la interacción entre DLL4 y la proteína Notch, y por tanto muestra excelentes efectos anticancerosos, completando de este modo la presente invención.

Las realizaciones de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones 1 y 12.

Las realizaciones preferidas se reflejan en las reivindicaciones dependientes 2 a 11 y 13 a 16.

5 SOLUCIÓN TÉCNICA

Es un objeto de la presente invención proporcionar una proteína de objetivo doble que comprende: una proteína que se une específicamente a DLL4, que reconoce un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los
10 residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21; y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que codifica la proteína de objetivo
15 doble descrita anteriormente, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y un transformante que comprende el vector de expresión.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método para producir la proteína de objetivo
doble.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición que comprende la proteína de
20 objetivo doble descrita anteriormente.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar el
25 cáncer, que comprende la proteína de objetivo doble descrita anteriormente.

Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar una composición para diagnosticar
cáncer, que comprende la proteína de objetivo doble descrita anteriormente.

Un objeto adicional más de la presente invención es proporcionar la provisión de la proteína de objetivo
30 doble descrita anteriormente para su uso en un método para diagnosticar el cáncer.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un epítipo conformacional de DLL4 que
35 comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21.

Otro objeto adicional más de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une
específicamente a DLL4, que reconoce el epítipo conformacional descrito anteriormente.

Otro objeto adicional más de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que codifica el
40 anticuerpo monoclonal, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y un transformante que comprende el vector de expresión.

EFFECTOS VENTAJOSOS

45 La proteína de objetivo doble de acuerdo con la presente invención puede tratar el cáncer al unirse tanto a VEGF como a DLL4, y muestra una excelente afinidad de unión y efectos anticancerosos porque comprende una nueva proteína que se une específicamente a DLL4. Por tanto, puede ser ampliamente usada en los campos del tratamiento y diagnóstico del cáncer.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGS. 1a y 1b muestran la estructura de una proteína de objetivo doble capaz de unirse a DLL4 y VEGF.

La FIG. 2a muestra los resultados obtenidos al expresar una proteína de objetivo doble, que puede unirse a
55 tanto DLL4 como VEGF, en células CHO, purificando la proteína expresada y analizando la proteína purificada por SDS-PAGE.

La FIG. 2b muestra los resultados obtenidos al expresar una proteína de objetivo doble, que puede unirse a tanto DLL4 como VEGF, en células CHO, purificando la proteína expresada y analizando la proteína purificada mediante cromatografía SEC-HPLC.

La FIG. 3 muestra los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) realizado para
60 examinar las capacidades de la proteína de objetivo doble para unirse a DLL4 y VEGF.

La FIG. 4a muestra los resultados de un ensayo de Biacore realizado para medir la constante de disociación de equilibrio (KD) de la proteína de objetivo doble para DLL4, un antígeno que es objetivo de la proteína de objetivo doble.

La FIG. 4b muestra los resultados de un ensayo de Biacore realizado para medir la constante de disociación
65 de equilibrio (KD) de la proteína de objetivo doble para VEGF, un antígeno que es objetivo de la proteína de

objetivo doble.

La FIG. 5 muestra los resultados de un ELISA realizado para medir las capacidades de la proteína de objetivo doble para neutralizar DLL4 y VEGF.

La FIG. 6 muestra que el anticuerpo DLL4 y MLCK2 humano forma un complejo en presencia o ausencia de un reticulante.

La FIG. 7 muestra un modelo en el que un fragmento que consiste de los residuos de aminoácidos 58-65 [FRVCLKHF] de la secuencia de aminoácidos de DLL4 representada por la SEQ ID NO: 21 y un fragmento representado por la SEQ ID NO: 22 constituye una superficie molecular continua en un dominio C2 de DLL4 humano (residuos de aminoácidos 27-174).

La FIG. 8 muestra los resultados de la transferencia Western realizada para examinar las afinidades de unión de proteínas mutantes que codifican un fragmento de delección del dominio extracelular de cada uno del tipo salvaje y DLL4.

La FIG. 9a muestra que, cuando se realizó el tratamiento con el anticuerpo dirigido a VEGF Avastin, la proliferación de células endoteliales vasculares se inhibió de una manera dependiente de la concentración independientemente de la presencia o ausencia de DLL4.

La FIG. 9b muestra que, cuando se realizó el tratamiento con un anticuerpo contra DLL4 solamente, la proliferación de células endoteliales vasculares apareció solo en un grupo experimental con DLL4 de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo anti-DLL4.

La FIG. 9c muestra que, cuando se realizó el tratamiento con la proteína de objetivo doble, un grupo experimental sin DLL4 mostró un efecto inhibitorio de la proliferación similar al del tratamiento con el anticuerpo Avastin (barras negras), y un grupo experimental con DLL4 mostró una reducción en el efecto inhibitorio de la proliferación vascular en comparación con Avastin (barras blancas).

La FIG. 10 muestra los resultados del análisis de transferencia Western, que indican que la proteína de objetivo doble que se une a DLL4 y VEGF muestra una actividad de inhibición de las vías de señalización DLL4/Notch y VEGF/VEGFR en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).

La FIG. 11 muestra que la proteína de objetivo doble que se une a DLL4 y VEGF tiene un efecto anticanceroso más fuerte que Avastin en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico SCH humano resistente a Avastin construido en ratones desnudos.

La FIG. 12 muestra que la proteína de objetivo doble que se une a DLL4 y VEGF tiene un efecto anticanceroso más fuerte que Avastin en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón A549 humano resistente a Avastin construido en ratones desnudos.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de objetivo doble que comprende: una proteína que se une específicamente a DLL4, que reconoce un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21; y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

Como se usa en la presente, el término "proteína de objetivo doble" se refiere a una proteína capaz de unirse a dos antígenos diferentes (proteínas objetivo). Específicamente, la proteína de objetivo doble no se produce naturalmente y se produce preferiblemente mediante un método de ingeniería genética o cualquier otro método.

Para el propósito de la presente invención, la proteína de objetivo doble puede unirse tanto a VEGF que se sobreexpresa en células cancerosas como a DLL4 que se expresa en células endoteliales. La proteína de objetivo doble puede estar en forma de un anticuerpo. El término "proteína de objetivo doble", como se usa en la presente, puede usarse indistintamente con el término "anticuerpo de objetivo doble", "anticuerpo biespecífico" o "proteína de anticuerpo biespecífico". Preferiblemente, la proteína de objetivo doble de la presente invención puede dirigirse a VEGF y DLL4 como antígenos. La forma de la proteína de objetivo doble de acuerdo con la presente invención incluye una forma de proteína de objetivo doble en la que un anticuerpo del tipo IgG que se une específicamente a VEGF y una proteína que se une específicamente a DLL4 están conectados entre sí por un conector, pero no está limitado específicamente a esto. La estructura de la proteína de objetivo doble según la presente invención es como se muestra esquemáticamente en la FIG. 1a.

Específicamente, la proteína de objetivo doble de la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 20, pero no está limitada a ellas.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de proteína que comprende una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, y que sirve como un receptor que reconoce específicamente un antígeno. El término puede incluir todos los anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de longitud completa, y fragmentos de anticuerpos. Además, el término puede incluir formas producidas mediante ingeniería genética, como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heterogéneos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Un

anticuerpo de longitud completa tiene dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, en el que cada una de las cadenas ligeras está enlazada a la cadena pesada por un enlace disulfuro. El anticuerpo de longitud completa puede comprender IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, y los subtipos de IgG incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, el término anticuerpo puede incluir moléculas bivalentes, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Específicamente, los anticuerpos que se unen específicamente a VEGF pueden ser del tipo IgG.

En la presente invención, la proteína de objetivo doble puede ser una forma en donde un anticuerpo tipo inmunoglobulina G (IgG) que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y un anticuerpo de longitud completa, proteína tipo Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG o scFv que se une específicamente a DLL4 (ligando 4 tipo delta) están conectadas entre sí por un conector.

Típicamente, una inmunoglobulina y un scFv tienen cadenas pesadas y cadenas ligeras, y cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como dominios). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen cuatro regiones marco y tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" (en lo sucesivo referidas como "CDR"). Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena son referidas típicamente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que está localizada la CDR particular.

La proteína de objetivo doble de la presente invención, que comprende una proteína que se une específicamente a DLL4 y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF, muestra una fuerte afinidad por DLL4 y VEGF derivados de humanos, inhibe eficazmente la unión de células que expresan DLL4 (por ejemplo, células cancerosas o células endoteliales vasculares) al receptor de Notch 1 o Notch 4, y también inhibe un proceso angiogénico en el que las células endoteliales vasculares que expresan el receptor de VEGF se activan por el VEGF que se sobreexpresa en las células cancerosas. Por tanto, la proteína de objetivo doble de la presente invención puede mostrar un efecto terapéutico más fuerte en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

El anticuerpo de unión específica a VEGF y la proteína de unión específica a DLL4 de la proteína de objetivo doble de acuerdo con la presente invención pueden mantener su unión específica, y en particular, pueden inhibir simultáneamente dos objetivos (antígenos). Por tanto, el anticuerpo y la proteína pueden ser más efectivos que una proteína o anticuerpo que se une e inhibe un único objetivo, y estos pueden inhibir simultáneamente dos señales.

Como se usa en la presente, el término "fragmentos de anticuerpos" se refiere a fragmentos que tienen la capacidad de unirse a antígenos, e incluye formas de anticuerpos que se unen a antígenos, por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG y scFv. En particular, el término "fragmentos de anticuerpo" incluye scFv (fragmento variable de cadena sencilla), y en particular, incluye moléculas bivalentes o diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

Como se usa en la presente, el término "scFv (fragmento variable de cadena sencilla)" se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno y comprende los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que los dominios pueden estar presentes en una única cadena polipeptídica.

Como se usa en la presente, la frase "proteína de objetivo doble que comprende: una proteína que se une específicamente a DLL4, que reconoce un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21; y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)" puede incluir cualquier proteína de objetivo doble que pueda inhibir simultáneamente dos vías de señalización en las que estén implicadas DLL4 y VEGF. El anticuerpo de unión específica a VEGF y la proteína de unión específica a DLL4 de la proteína de objetivo doble pueden estar en forma de anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en la presente, la frase "proteína de unión específicamente a DLL4, que reconoce un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína de DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21 se refiere a una proteína que se une específicamente a un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína de DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21. La proteína significa una proteína que puede mostrar un efecto terapéutico contra el cáncer inhibiendo el crecimiento del cáncer. La proteína puede unirse al epítipo con alta afinidad, y puede funcionar para neutralizar la actividad de DLL4. La proteína puede bloquear la unión de DLL4 al receptor Notch, e inhibir la señalización mediada por DLL4. Una proteína que se une específicamente a un epítipo conformacional de DLL4 que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y 22 puede estar específicamente en la forma de anticuerpos de longitud completa, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, o scFv (fragmento variable de cadena sencilla).

La unión de la proteína específicamente a un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos

de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína de DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21, específicamente, la proteína que se une específicamente a DLL4 puede comprender: una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2, la CDR2 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 3, y la CDR3 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 5, la CDR2 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 6 y la CDR3 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 7.

Más específicamente, la cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 9. Sin embargo, la proteína también puede ser cualquier proteína que comprenda las secuencias de CDR descritas anteriormente y se pueda unir específicamente a DLL4 para mostrar un efecto terapéutico contra el cáncer. La cadena pesada y la cadena ligera pueden estar conectadas entre sí por un conector.

Además, la proteína de unión específica a DLL4 de la proteína de objetivo doble de la presente invención puede unirse específicamente no solo a DLL4 humano, sino también a DLL4 de ratón, y puede inhibir la interacción entre la proteína de DLL4 y de Notch.

En un ejemplo de la presente invención, se identificó el epítipo del anticuerpo de unión específica a DLL4 de la proteína de objetivo doble de la presente invención, que tiene una excelente actividad biológica de inhibición de DLL4 y VEGF. Específicamente, en la presente invención, se descubrió que el anticuerpo se une a la superficie molecular continua de DLL4, que consiste de los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de DLL4. Por tanto, los residuos de aminoácidos 58° a 65° (SEQ ID NO: 22) y/o 110° a 115° (SEQ ID NO: 23) en la secuencia de aminoácidos de DLL4 puede ser el epítipo del anticuerpo de unión específica a DLL4 de acuerdo con la presente invención. Más específicamente, una región de superficie molecular de DLL4, que consiste de las SEQ ID NO: 22 y 23, puede ser un epítipo conformacional.

Como se usa en la presente, el término "ligando 4 tipo delta (DLL4)" se refiere a uno de los ligandos de clase delta que se unen a los receptores de Notch y preferiblemente se refiere a una proteína de unión a Notch 1 o Notch 2, pero no está limitada a las mismas. DLL4 puede ser cualquier DLL4 de mamífero, pero es preferiblemente DLL4 humano o de ratón. Se sabe que el DLL4 está sobreexpresado en varias células tumorales, incluyendo las vasculaturas tumorales, y promueve el crecimiento del cáncer aumentando el número de vasculaturas anormales en los modelos de xenoinjerto.

Por tanto, la proteína de objetivo doble de la presente invención, que comprende una proteína que se une específicamente a un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína de DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21, puede usarse eficazmente para tratar el cáncer inhibiendo la función de DLL4. La información sobre DLL4 puede obtenerse de bases de datos conocidas, incluyendo GenBank de los National Institutes of Health, y puede ser, por ejemplo, información de DLL4 que es el Número de Acceso de GenBank NM_019074.3 (ID de Gen: 54567 y Secuencia de Referencia de NCBI: NM_019074.3). El DLL4 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

Como se usa en la presente, el término "receptor Notch" se refiere a una proteína que media la señalización Notch, y puede usarse indistintamente con Notch. El receptor de Notch puede ser cualquier proteína que media la señalización Notch. Preferiblemente, el receptor Notch puede ser el receptor Notch 1 o Notch 4, pero no está limitado a ellos.

Como se usa en la presente, la frase "inhibir la interacción entre el ligando 4 tipo delta humano (DLL4) y el receptor Notch" significa que la proteína de unión específica a DLL4 de la presente invención se une a DLL4 para inhibir la interacción entre DLL4 y el receptor Notch. Preferiblemente, la frase significa que la proteína de objetivo doble específica para el epítipo conformacional de DLL4, que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de la proteína de DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21, se une a DLL4 para inhibir la interacción entre DLL4 y el receptor Notch 1 o Notch 4, pero no está limitada a ello. Cuando la proteína de objetivo doble de la presente invención se une específicamente al epítipo conformacional de DLL4, que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de la proteína de DLL4 (ligando 4 tipo delta) representada por la SEQ ID NO: 21, evita que los receptores Notch se modifiquen estructuralmente mediante la unión de DLL4 a la misma. Por tanto, evita la hidrólisis de las proteínas Notch para inhibir la señalización Notch. Se sabe que cuando DLL4 se une al receptor Notch en los tumores, aumenta el tamaño de los vasos sanguíneos y activa la señalización entre las células endoteliales vasculares o la señalización Notch entre las células cancerosas y las células endoteliales vasculares, asumiendo de este modo un papel en la proliferación y metástasis de los tumores.

Por tanto, cuando se inhibe la señalización Notch por DLL4 en los tumores, la angiogénesis no puede

controlarse fácilmente y, por tanto, puede inhibirse el crecimiento de los tumores. Además, cuando se bloquea el DLL4, la pérdida de inhibición lateral en las células al final de un sitio angiogénico parece provocar un brote excesivo, lo que da como resultado una disminución de las reacciones angiogénicas que tienen baja productividad, y puede reducirse la perfusión para suministrar oxígeno para inducir la hipoxia alrededor de los tumores, dando como resultado efectos antitumorales incluso contra tumores que muestran resistencia a la terapia anti-VEGF.

Por consiguiente, la proteína de objetivo doble de la presente invención, que comprende la proteína de unión específica a DLL4 que inhibe eficazmente la interacción entre DLL4 y Notch, puede usarse eficazmente para el tratamiento del cáncer.

Como se usa en la presente, la frase "anticuerpo que se une específicamente a VEGF" o "anticuerpo de unión específica a VEGF" incluye todos los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno VEGF en células tumorales. Específicamente, el anticuerpo puede ser Bevacizumab (Avastin®), un anticuerpo terapéutico que está dirigido a VEGF, pero no está limitado a él. Tales anticuerpos que se unen específicamente a VEGF pueden incluir anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos como se ha descrito anteriormente, y pueden ser anticuerpos IgG, pero no están limitados a ellos. El VEGF es un ligando que desempeña un papel importante en la angiogénesis, y cuando se inhibe el VEGF, no se producirá angiogénesis y, por tanto, puede tratarse el cáncer. Bevacizumab (Avastin®, Genentech) aprobado por la FDA de los Estados Unidos es un anticuerpo terapéutico que puede usarse establemente.

El anticuerpo que se une específicamente a VEGF, específicamente, puede comprender: una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 10, la CDR2 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 11, y la CDR3 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 12; y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 13, la CDR2 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 14 y la CDR3 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 15. Más específicamente, el anticuerpo que se une específicamente a VEGF puede comprender una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 16 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 17. Sin embargo, el anticuerpo también puede ser cualquier anticuerpo que comprende las secuencias de CDR descritas anteriormente y puede unirse específicamente a VEGF para mostrar un efecto terapéutico contra el cáncer.

El anticuerpo de unión específica a VEGF de la proteína de objetivo doble de acuerdo con la presente invención puede unirse específicamente a VEGF que se sobreexpresa en células tumorales, y puede por tanto concentrar la proteína de objetivo doble de la presente invención sobre células tumorales que expresan VEGF. También, puede mostrar actividad anticancerosa uniéndose a VEGF.

Como se usa en la presente, el término "factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)" se refiere a un tipo de factor de crecimiento que mejora la actividad de crecimiento de las células endoteliales vasculares y se secreta por varios tipos de células, incluyendo macrófagos, células de músculo liso y células tumorales. El VEGF desempeña un papel importante en la angiogénesis fetal y también funciona para inducir la angiogénesis para suministrar oxígeno al tejido tumoral en el que se produce un rápido crecimiento y metabolismo. Las vías en las que están implicadas la proteína VEGF y su receptor se han estudiado como vías de señalización objetivo los agentes anticancerosos en adultos.

Además, el sitio de unión a VEGF de la proteína de objetivo doble significa inhibir la interacción entre VEGF humano y el receptor de VEGF. Específicamente, significa que la proteína de objetivo doble específica para VEGF se une a VEGF para inhibir la interacción entre VEGF y VEGFR-2, pero no está limitada a ello.

Para los propósitos de la presente invención, el receptor de VEGF puede ser cualquier proteína que se una al VEGF de mamífero. Específicamente, puede ser una proteína que se une a VEGF humano.

Cuando la interacción entre VEGF y el receptor de VEGF es inhibida por la proteína de objetivo doble específica de VEGF de la presente invención, se inhibirá la señalización de VEGF/VEGF por la unión de VEGF al receptor de VEGF. Se sabe que cuando el VEGF y el receptor de VEGF en los tumores se unen entre sí, la señalización de VEGF/receptor de VEGF en las células estromales/endoteliales del tejido canceroso se activa para inhibir fuertemente la angiogénesis, a diferencia del mecanismo de la vía de señalización DLL4/Notch, para reducir el número de vasos sanguíneos y debilitar una función vascular en los tumores, inhibiendo de este modo la proliferación del cáncer y la metástasis.

Por tanto, la proteína de objetivo doble de la presente invención, que es específica para DLL4 y VEGF, muestra la capacidad de inhibir la angiogénesis en el tejido canceroso mediante un mecanismo diferente, y por tanto puede usarse como un agente terapéutico que tiene mejor actividad anticancerosa.

Específicamente, la proteína de objetivo doble puede ser una forma en la que la proteína que se une específicamente a DLL4 y el anticuerpo tipo IgG (inmunoglobulina G) que se une específicamente a VEGF están

conectados entre sí por un conector.

Como se usa en la presente, el término "conector" se refiere a cualquier fracción que puede conectar dos compañeros de fusión diferentes (por ejemplo, polímeros biológicos) mediante el uso de un enlace de hidrógeno, interacción electrostática, fuerza de van der Waals, un enlace disulfuro, un puente salino, interacción hidrófoba, un enlace covalente, etc. Específicamente, el conector puede tener por lo menos un residuo de cisteína que puede participar en por lo menos un enlace disulfuro en condiciones fisiológicas u otras condiciones peptídicas estándar (por ejemplo, condiciones para purificar o almacenar péptidos). Además de conectar a los compañeros de fusión, el conector puede servir como un espaciador y proporcionar un espacio entre los compañeros de fusión o como una bisagra para proporcionar flexibilidad o rigidez al conjugado. El conector puede ser un conector peptídico o un conector no peptídico. La conexión directa entre los compañeros de fusión a través de un enlace peptídico o un enlace disulfuro está dentro del alcance del papel del conector.

En la presente invención, el conector puede ser preferiblemente un polipéptido que puede conectar la proteína de unión específica a DLL4 con el anticuerpo de unión específica a VEGF, pero no está limitado específicamente a esto. Más preferiblemente, el conector puede ser un conector peptidílico que puede conectar el extremo C-terminal de la región Fc del anticuerpo de unión específica a VEGF con la proteína de unión específica a DLL4. Más preferiblemente, el conector puede ser un conector peptidílico que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de tres repeticiones de un motivo GGGGS. El motivo GGGGS puede repetirse 1-10 veces. Más preferiblemente, el conector puede comprender una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 19.

Péptido conector (SEQ ID NO: 18): GGGSGGGSGGGGS

Polinucleótido conector (SEQ ID NO: 19): GGTGGAGGTGGCAGCGGTGGTGGCGGCAGTC
CCGGTGGCGGCTCC

Como se usa en la presente, el término "conector no peptídico" se refiere a un conector biocompatible que consiste de por lo menos dos unidades de repetición que pueden estar conectadas entre sí por cualquier enlace covalente no peptidílico.

Los ejemplos de conector no peptídico que se usa en la presente invención incluyen homopolímeros de polietilenglicol (PEG), homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxetilado, alcoholes polivinílicos, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter), polímeros biodegradados, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el conector no peptidílico puede ser un homopolímero de polietilenglicol. Los derivados que ya se conocen en la técnica o se pueden preparar fácilmente en el nivel técnico de la técnica están dentro del alcance de la presente invención. Más preferiblemente, el conector no peptidílico puede ser un homopolímero de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1 a 5 kDa. Más preferiblemente, puede ser un conector que tiene un peso molecular de 3,4 kDa y que contiene grupos aldehído en ambos extremos, que pueden conectar el anticuerpo de unión específico a VEGF con la proteína de unión específica a DLL4. Particularmente, los grupos funcionales aldehído en ambos extremos son eficaces para minimizar reacciones no específicas.

Las regiones que están conectadas directa o indirectamente a través del conector incluyen fragmentos Fc, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y similares, pero no están específicamente limitados a ellos. La proteína de objetivo doble puede ser: una forma en la que la totalidad o parte de la proteína de unión específica a DLL4 está conectada a la totalidad o parte del anticuerpo de unión específico a VEGF; o una forma en la que la totalidad o parte de la proteína de unión específica a DLL4 está conectada a la totalidad o parte del anticuerpo de unión específica a VEGF por un conector peptidílico; o una combinación de los mismos, pero la proteína de objetivo doble no está limitada a ellos.

Además, la proteína de objetivo doble puede ser: una forma en la que la totalidad o parte de la proteína de unión específica a DLL4 está conectada a la totalidad o parte de una cadena pesada de anticuerpo de unión específica a VEGF por un conector peptidílico; una forma en la que la totalidad o parte de la proteína de unión específica a DLL4 está conectada a la totalidad o parte de una cadena ligera de anticuerpo de unión específica a VEGF por un conector peptidílico; o una combinación de los mismos.

En un ejemplo de la presente invención, la proteína de objetivo doble de Avastin-DLL4 BsAb que se une específicamente a DLL4 y VEGF se construyó conectando el extremo C terminal de la región de cadena pesada de Avastin de tipo IgG con una proteína de unión a DLL4 de tipo scFv mediante un conector para preparar un polinucleótido que codifica una proteína de objetivo doble, insertando el polinucleótido en un vector, introduciendo el vector en células animales, y aislando una proteína de objetivo doble de unión a DLL4 Avastin de las células. La molécula de proteína de objetivo doble tiene una estructura en la que una molécula de anticuerpo IgG de Avastin está conectada a un scFv de unión a DLL4 mediante un conector (FIG. 1). Se aisló la proteína de objetivo doble de unión a Avastin-DLL4 expresada en células animales, y se midió la expresión y la pureza de la misma (FIGS. 2a y 2b). Además, se descubrió que la proteína de objetivo doble de unión a DLL4 Avastin se une específicamente a los objetivos VEGF y DLL4 (FIG. 3). Además, se demostró que la afinidad de unión de la proteína de objetivo doble para

cada uno de los antígenos era similar a la de un anticuerpo de control. Específicamente, la proteína de objetivo doble mostró un valor KD de 30 nM para DLL4 humano y un valor KD de 0,126 nM para VEGF humano (Tablas 2 y 3). Además, se demostró que la vía de señalización provocada por cada uno de la unión a DLL4 de célula vascular endotelial DLL4 y el receptor Notch 1 humano y la unión de VEGF al receptor de VEGF se inhibía eficazmente mediante el tratamiento con la proteína de objetivo doble (FIG. 10). Tales resultados sugieren que la proteína de objetivo doble de la presente invención, que es específica para DLL4 y VEGF, puede bloquear eficazmente la unión de DLL4 al receptor Notch y la unión de VEGF al receptor VEGF, proporcionando de este modo un efecto anticanceroso. Se descubrió el efecto anticanceroso de la proteína de objetivo doble en los modelos de xenoinjerto de cáncer gástrico SCH y cáncer de pulmón A549 humanos resistentes a Avastin (FIGS. 11 y 12).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica la proteína de objetivo doble, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y un transformante introducido con el vector de expresión.

Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de objetivo doble de acuerdo con la presente invención no está específicamente limitado, pero puede ser un vector capaz de replicar y/o expresar el polinucleótido en células eucariotas o procariotas, incluyendo células de mamíferos (por ejemplo, células de humano, mono, conejo, rata, hámster o ratón), células vegetales, células de levadura, células de insecto y células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*). Preferiblemente, puede ser un vector, que comprende por lo menos un marcador selectivo y está enlazado operativamente a un promotor adecuado de tal manera que el polinucleótido puede expresarse en una célula huésped. Más preferiblemente, el vector puede comprender el polinucleótido introducido en un vector de fago, plásmido, cósmido, minicromosoma, virus o retrovirus.

El vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de objetivo doble puede ser o un vector de expresión que comprende cada polinucleótido que codifica la cadena pesada o ligera de la proteína de objetivo doble o un vector de expresión que comprende todos los polinucleótidos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de la proteína de objetivo doble.

Las células en las que se va a introducir el vector de expresión de la presente invención para formar transformantes incluyen células bacterianas como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células de levadura; células fúngicas como *Pichia pastoris*; células de insecto tales como células de *Drosophila* o *Spodoptera Sf9*; células animales como células de ovario de hámster chino (CHO), SP2/0 (mieloma de ratón), linfoblastoide humano, COS, NSO (mieloma de ratón), 293T, células de melanoma de Bowes, HT-1080, BHK (células de riñón de cría de hámster), HEK (células renales embrionarias humanas), PERC.6 (células retinales humanas), y similares; y células vegetales. En un ejemplo de la presente invención, se usaron células CHO-S como células huésped.

Como se usa en la presente, el término "introducción" se refiere al suministro del vector que comprende el polinucleótido que codifica la proteína de objetivo doble en una célula huésped. Esta introducción puede realizarse mediante varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo la coprecipitación de fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, transfección mediada por liposomas, fusión liposómica, lipofección y fusión de protoplastos. Además, la transfección significa suministrar un material deseado en una célula por medio de una infección usando partículas virales. Además, el vector puede introducirse en una célula huésped mediante bombardeo génico. En la presente invención, la introducción puede usarse indistintamente con la transfección.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para producir la proteína de objetivo doble.

Preferiblemente, el método para producir la proteína de objetivo doble puede ser un método para producir una proteína de objetivo doble que comprende una proteína que se une específicamente a DLL4 y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), el método comprendiendo los pasos de: (a) cultivar el transformante para producir una proteína de objetivo doble; y (b) recuperar la proteína de objetivo doble producida en el paso (a).

Más preferiblemente, el método para producir la proteína de objetivo doble puede ser un método que comprende los pasos de: (a) preparar un polinucleótido que codifica un anticuerpo que se une específicamente a VEGF, y un polinucleótido que codifica una proteína que se une específicamente a DLL4 y que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2, la CDR2 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 3, y la CDR3 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 5, la CDR2 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 6, y la CDR3 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 7; (b) conectar el extremo 3' de la parte del polinucleótido que codifica la región Fc del polinucleótido que codifica el anticuerpo de unión específica a VEGF, preparado en el paso (a), al extremo 5' del polinucleótido que codifica la proteína de unión específica a DLL4 mediante un conector, obteniendo de este modo un polinucleótido que codifica la proteína de objetivo doble; (c) clonar el polinucleótido que codifica la proteína de

objetivo doble del paso (b) para preparar un vector de expresión; (d) introducir el vector de expresión del paso (c) en una célula huésped para obtener un transformante, y cultivar el transformante; y (e) recuperar la proteína de objetivo doble del transformante del paso (d).

Además, el método para producir la proteína de objetivo doble puede ser un método que comprende los pasos de: (a) preparar un polinucleótido que codifica un anticuerpo que se une específicamente a VEGF, y un polinucleótido que codifica una proteína que se une específicamente a DLL4 y que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2, la CDR2 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 3, y la CDR3 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 5, la CDR2 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 6, y la CDR3 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 7; (b) clonar el polinucleótido del paso (a) para preparar un vector de expresión; (c) introducir el vector de expresión del paso (b) en una célula huésped para obtener un transformante, y cultivar el transformante; y (d) recuperar el anticuerpo de unión específico a VEGF y la proteína de unión específica a DLL4 del transformante del paso (c), y conectar el extremo C-terminal de la región Fc del anticuerpo de unión específica de VEGF al extremo N-terminal de la proteína de unión específica a DLL4 mediante un conector.

La proteína de objetivo doble de la presente invención puede producirse mediante una técnica de recombinación o un método bioquímico conocidos, y el anticuerpo puede introducirse en una célula huésped adecuada y recuperarse del medio de cultivo del transformante.

Específicamente, la proteína de objetivo doble puede aislarse mediante un método de aislamiento conocido. Por ejemplo, la proteína de objetivo doble puede aislarse adecuadamente del medio de cultivo mediante un procedimiento de purificación convencional como la proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad, pero no está limitado a esto.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición que comprende la proteína de objetivo doble.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el cáncer, que comprende la proteína de objetivo doble.

La proteína de objetivo doble puede unirse tanto a DLL4 como VEGF para inhibir la unión de DLL4 y VEGF al receptor de Notch y VEGF, inhibiendo de este modo el crecimiento del cáncer. El receptor de DLL4/Notch y el receptor de VEGF/VEGF son como se ha descrito anteriormente. Cuando la composición de la presente invención, que comprende la proteína de objetivo doble que se une específicamente a DLL4 y VEGF, se administra *in vivo*, puede inhibir el desarrollo, la proliferación o la metástasis del cáncer o prevenir la progresión del cáncer, tratando de este modo el cáncer.

Como se usa en la presente, el término "cáncer" incluye todos los tipos de cánceres sin limitaciones, pero los ejemplos de cáncer pueden incluir cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de recto, cáncer de boca, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer de tejido conectivo, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, leucemia, enfermedad de Hodgkin, linfoma, y cáncer de sangre mieloide múltiple. Como se usa en la presente, el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones que restauran o cambian beneficiosamente los síntomas del cáncer al administrar la composición.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o diluyente que no deteriora la actividad biológica y las características de un compuesto administrado sin irritar un organismo. Como un portador farmacéuticamente aceptable en una composición que se formula como una solución líquida, se usa un portador estéril y biocompatible. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser solución salina fisiológica, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de inyección de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol o una mezcla de dos o más de los mismos. Además, la composición de la presente invención puede, si es necesario, comprender otros aditivos convencionales, incluyendo antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos. Además, la composición de la presente invención puede formularse como formas inyectables tales como soluciones acuosas, suspensiones o emulsiones con la ayuda de diluyentes, dispersantes, surfactantes, aglutinantes y lubricantes. Además, la composición de acuerdo con la presente invención puede formularse en forma de píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse de varias maneras, como una formulación oral o parenteral. Para formulaciones, se usan diluyentes o excipientes comúnmente usados como

cargas, expansores, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes y surfactantes, etc. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención se formula usando diluyentes o excipientes, como cargas, diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes o surfactantes, que se usan comúnmente. Las formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc. Tales formulaciones se preparan mezclando el compuesto de la presente invención con por lo menos un excipiente, como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, gelatina, etc. Además de excipientes simples, también pueden añadirse lubricantes como estearato de magnesio, talco, etc. Las formulaciones líquidas para administración oral, como suspensiones, soluciones internas, emulsiones, jarabes, etc., pueden incluir diluyentes simples, por ejemplo, agua y parafina líquida, así como varios excipientes, por ejemplo, agentes humectantes, edulcorantes, agentes aromáticos, conservantes, etc. Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas esterilizadas, solventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, agentes liofilizados, supositorios, etc. Los solventes y suspensiones no acuosos pueden prepararse usando propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva, o ésteres inyectables como etiloleato. Como base para supositorios, se pueden usar Witpsol, Macrogol, Tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina, glicerogelatina, etc.

La composición farmacéutica puede tener cualquier formulación seleccionada del grupo que consiste de comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, suspensiones, soluciones internas, emulsiones, jarabes, soluciones acuosas esterilizadas, solventes no acuosos, agentes liofilizados y supositorios.

La composición farmacéutica de la presente invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

Como se usa en la presente, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para tratar enfermedades con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El nivel de dosificación eficaz de la composición puede determinarse dependiendo del tipo de sujeto, la gravedad de la enfermedad, la edad y el sexo del sujeto, el tipo de enfermedad, la actividad del fármaco, la sensibilidad al fármaco, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento, factores que incluyen los fármacos usados en combinación con la composición y otros factores conocidos en el campo médico. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse individualmente o en combinación con otros agentes terapéuticos, y puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con agentes terapéuticos convencionales. La composición puede administrarse en una forma de dosificación única o múltiple. Es importante administrar la composición en la cantidad mínima que pueda mostrar el efecto máximo sin provocar efectos secundarios, en vista de todos los factores descritos anteriormente, y esta cantidad puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

En un ejemplo de la presente invención, se descubrió que la proteína de objetivo doble de la presente invención podía unirse a VEGF y DLL4 (FIGS. 3, 4a y 4b), podía neutralizar DLL4 (FIG. 5), y mostró un efecto anticanceroso en los modelos de xenoinjerto de cáncer de estómago SCH y de cáncer de pulmón A549 humanos resistentes a Avastin (FIGS. 11 y 12), indicando que la proteína de objetivo doble puede usarse como un ingrediente activo en composiciones para tratar el cáncer.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una proteína de objetivo doble para su uso en un método para tratar el cáncer. La proteína de objetivo doble y la cantidad farmacéuticamente eficaz son como se ha descrito anteriormente.

El uso de la proteína de objetivo doble en un método para tratar el cáncer puede comprender administrar una composición farmacéutica que comprende la proteína de objetivo doble junto con un portador farmacéuticamente aceptable a un sujeto que tiene cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. En la presente, el portador farmacéuticamente aceptable y el cáncer son como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos del sujeto incluyen mamíferos, incluyendo ganado vacuno, cerdos, ovejas, pollos, perros y humanos. El sujeto puede ser cualquier sujeto en el que el cáncer debe tratarse mediante la administración de la composición de la presente invención.

En este caso, la composición puede administrarse en forma de líquido, polvo, aerosol, cápsula, comprimido con recubrimiento entérico o supositorio. La composición de la presente invención puede administrarse por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar o intrarrectal, pero no está limitado a ello. Sin embargo, debido a que el péptido se digiere cuando se administra por vía oral, se requiere que el ingrediente activo en la composición para administración oral se recubra o formule para estar protegido de la degradación en el estómago. Además, la composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier dispositivo mediante el cual el ingrediente activo puede administrarse a las células objetivo.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para diagnosticar cáncer, que comprende la proteína de objetivo doble.

La proteína de objetivo doble y el cáncer son como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en la presente, el término "diagnosticar" significa detectar la presencia o característica de una condición patológica. Para los propósitos de la presente invención, el término "diagnosticar" significa detectar la aparición de cáncer.

5 La composición para diagnosticar cáncer de acuerdo con la presente invención puede usarse como sigue. Se mide el nivel de proteína de VEGF o DLL4 en una muestra aislada de un sujeto que se sospecha tiene cáncer usando la proteína de objetivo doble, y se determina que el sujeto tiene cáncer, si el nivel medido de VEGF o DLL4 es más alto que el de una muestra de control normal.

10 Para este fin, los métodos de análisis para medir la cantidad de la proteína incluyen, pero no están limitados a, inmunotransferencia (transferencia Western), ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas), radioinmunoensayo (RIA), radioinmunodifusión, inmunocifusión Ouchterlony, inmunoelectroforesis en cohete, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de fijación del complemento, FACS, y ensayo de chip de proteína. Los niveles de proteína de VEGF o DLL4 en una muestra de control normal y un sujeto sospechoso de tener cáncer pueden compararse entre sí mediante los métodos de análisis y, por tanto, se puede diagnosticar realmente la aparición del

15 cáncer en un paciente que se sospecha que tiene cáncer.

La composición para diagnosticar cáncer de acuerdo con la presente invención puede comprender además, además de la proteína de objetivo doble, aquellas conocidas en la técnica que se requieren para realizar el método para medir el nivel de la proteína.

20

En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona una proteína de objetivo doble para su uso en un método para diagnosticar cáncer, que comprende los pasos de: (a) medir el nivel de proteína de VEGF o DLL4 en una muestra, aislada de un sujeto sospechoso de tener cáncer, usando la proteína de objetivo doble; y (b)

25 determinar que el sujeto tiene cáncer, si el nivel de proteína de VEGF o DLL4 medido en el paso (a) es mayor que en una muestra de control normal.

En la presente, la proteína de objetivo doble, el cáncer, el sujeto, el diagnóstico y el método (paso) para medir el nivel de la proteína, son como se ha descrito anteriormente.

30

Tal como se usa en la presente, el término "muestra" incluye sangre completa, suero, sangre, plasma, saliva, orina, flema, linfa, líquido cefalorraquídeo, y fluido intersticial, en el cual hay una diferencia en el nivel de expresión de VEGF o DLL4 en un paciente con cáncer, pero no está limitado a ello.

35 En otra adicional, la presente invención proporciona un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° y 110° a 115° en la secuencia de aminoácidos de una proteína de DLL4 (ligando 4 de tipo delta) representado por la SEQ ID NO: 21.

En un ejemplo de la presente invención, los residuos de aminoácidos en DLL4 de la SEQ ID NO: 21, que están reticulados, se identificaron mediante una reacción de reticulación y espectrometría de masas. Como se muestra en la FIG. 7, se descubrió que los dos fragmentos, una secuencia de aminoácidos que consistía de los residuos de aminoácidos 58° a 65° [FRVCLKHF], y una secuencia de aminoácidos que consistía de los residuos de aminoácidos 110° a 115° (SEQ ID NO: 23), constituyeron una superficie molecular continua, formando de este modo el epítipo de DLL4.

40

En otro aspecto adicional más, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a DLL4, que reconoce el epítipo conformacional.

45

Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede comprender: una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2, la CDR2 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 3, y la CDR3 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 5, la CDR2 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 6 y la CDR3 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 7. Más específicamente, la cadena puede comprender una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 8, y la región variable de la cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 9.

50

55

En otro aspecto adicional más, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y un transformante introducido con el vector de expresión.

60

En la presente, el DLL4, el anticuerpo monoclonal, el vector, el transformante, etc., de la presente invención son como se ha descrito anteriormente.

65 En otro aspecto adicional más, la presente invención proporciona una proteína de objetivo doble para su

uso en un método para tratar el cáncer, que comprende un paso de administrar la proteína de objetivo doble a un sujeto sospechoso de tener cáncer.

El sujeto es un sujeto con necesidad de la prevención o el tratamiento del cáncer, y puede seleccionarse de mamíferos, incluyendo humanos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, camellos, antílopes, perros y gatos con necesidad de tratamiento para el cáncer y síntomas similares a los mismos, pero no está limitado a ellos.

Como se usa en la presente, el término "administración" significa la introducción de la composición farmacéutica de la presente invención en un paciente mediante cualquier método adecuado. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por varias vías orales o parenterales, siempre que pueda alcanzar un tejido deseado.

La proteína de objetivo doble para su uso en un método de tratamiento del cáncer como se divulga en la presente invención incluye administrar la proteína de objetivo doble o la composición farmacéutica que comprende la proteína de objetivo doble en una cantidad terapéuticamente eficaz. Es evidente para los expertos en la técnica que la dosis diaria total adecuada de la composición puede determinarse por un médico o veterinario asistente dentro del alcance del buen juicio médico. Además, la composición puede administrarse una vez o varias veces dentro del intervalo preferido de su cantidad eficaz. En vista del propósito de la presente invención, sin embargo, la cantidad terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente en particular dependerá de varios factores, incluyendo el tipo y el grado de respuesta a lograr, composiciones específicas de acuerdo si se usan otros agentes con la misma o no, la edad del paciente, el peso corporal, el estado de salud, el sexo y la dieta, el tiempo y la vía de administración, la tasa de secreción de la composición, la duración del tratamiento, y otros fármacos usados en combinación o coincidente con la composición, y otros factores similares bien conocidos en el campo médico.

EJEMPLOS

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Será obvio para una persona experta en la técnica que estos ejemplos son solo con propósitos ilustrativos y no debe interpretarse que limitan el alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Preparación de la proteína de objetivo doble anti-DLL4/VEGF

Ejemplo 1-1: Preparación de antígeno DLL4

Como el antígeno de dominio extracelular de DLL4 humano, se usó la proteína de DLL4 humana (Cat: 1506-D4/CF) adquirida de R&D System. La proteína antigénica de DLL4 comprende los residuos de aminoácidos 27 a 524 de la secuencia de aminoácidos de DLL4 (N° de acceso Q9NR61). El extremo C-terminal de la proteína tiene un marcador 10-His.

Se preparó un antígeno correspondiente a una región específica del dominio extracelular de DLL4. Esta región específica comprende los residuos de aminoácidos 27 a 251. Esta región contiene un motivo llamado dominio "DSL (delta/Serrate)/lag-2" que se sabe se une al receptor Notch 1. Se preparó un plásmido de vector de expresión de mamífero que comprende un promotor de CMV en sentido ascendente de un polinucleótido que codifica un fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) del dominio extracelular de DLL4 fusionado con proteína Fc, usando una técnica de ADN recombinante estándar. Se preparó un constructo adicional que codifica el fragmento de delección de DLL4, que es una quimera de DLL4 humano fusionado con proteína Fc, usando una técnica de ADN recombinante general. Los constructos preparados se transfectaron de forma transitoria en células HEK 293E para expresar proteínas de fusión recombinantes que comprenden los residuos de aminoácidos 27 a 251 de la secuencia de aminoácidos de DLL4 humano fusionada con proteína Fc. Para recuperar la proteína antigénica, se recogieron los medios de acondicionamiento cada 72 horas, y este proceso se repitió cuatro veces. La proteína antigénica se purificó del medio de acondicionamiento mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Ejemplo 1-2: Preparación de fago de bibliotecas

Se cultivaron $2,7 \times 10^{10}$ células de la biblioteca scFv humana (fragmento variable de cadena sencilla) que tenían diversidad en un medio (3 l) que contenía 17 g de 2X YT CM [triptonona (CONDA, 1612.00), 10 g de extracto de levadura (CONDA, 1702.00), 5 g de NaCl (Sigma, S7653-5 kg), $34 \mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol (Sigma, c0857)], 2% de glucosa (Sigma, G5400) y MgCl_2 5 mM (Sigma, M2393) a 37°C durante 2-3 horas ($\text{OD}_{600} = 0,5-0,7$), después de lo cual las células se infectaron con el fago auxiliar y se cultivaron en medio 2X YT CMK (2X YT CM, $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina (Sigma, K1876), IPTG 1 mM (ELPISBIO, IPTG025) a 30°C durante 16 horas. Las células cultivadas se centrifugaron (4500 rpm, 15 min, 4°C) y el sobrenadante se añadió y se disolvió en PEG al 4% (Fluka, 81253) y NaCl al 3% (Sigma, S7653) y luego se incubó en hielo durante 1 hora. Luego, la solución se centrifugó (8000 rpm, 20 min, 4°C) y los sedimentos se añadieron y se disolvieron en PBS y luego se centrifugaron (12000 rpm, 10 min, 4°C). El sobrenadante que comprendía fagos de biblioteca se colocó en un tubo nuevo y se almacenó a 4°C .

Ejemplo 1-3: Selección por expresión de fagos

Para seleccionar un anticuerpo anti-DLL4 que se une a DLL4 humano, se realizó una selección de antígeno DLL4 humano durante 3 rondas.

Se añadieron 10 $\mu\text{g/ml}$ de una solución de DLL4 humano recombinante (R&D System) a un inmunotubo, y la proteína se adsorbió sobre la superficie del inmunotubo durante la noche a 4° C, y luego se añadió una solución de 1% de albúmina de suero bovino al inmunotubo para proteger la superficie no adsorbida con DLL4. Después de que se evacuase el inmunotubo, se añadieron 10^{12} CFU de la biblioteca de fagos de anticuerpos dispersada en albúmina de suero bovino al 1% para unirse al antígeno. El fago unido no específicamente se lavó con una solución de PBS-T (solución salina tamponada con fosfato - Tween 20 al 0,05%), y luego se recuperó el anticuerpo del fago específico del antígeno restante usando una solución de trietilamina 100 mM.

El fago recuperado se neutralizó con tampón tris 1 M (pH 7,4) y se infectó en *E. coli* ER2537 a 37° C durante 1 hora, y las células de *E. coli* infectadas se colocaron en placas en medio de agar LB (Luria-Bertani) que contenía carbenicilina y se cultivo durante la noche a 37° C. Al día siguiente, las células de *E. coli* cultivadas se suspendieron en 4 ml de medio de SB (superbroth)-carbenicilina, y se le añadió glicerol al 15%. Una parte de la suspensión se almacenó a -80° C, y 50 μl del resto se cultivó en medio SB-carbenicilina que contenía glucosa al 2% a 37° C.

Cuando la absorbancia del medio de cultivo alcanzó 0,6 a 600 nm (OD_{600}), el medio de cultivo se eliminó por centrifugación y el material restante se suspendió nuevamente en 20 ml de medio de SB-carbenicilina, y se obtuvieron 10^{12} PFU de fago adyuvante VCSM13 añadido a ello, seguido de incubación a 37° C con agitación lenta. Al día siguiente, el medio de cultivo se recogió por centrifugación y se precipitó en polietilenglicol 8000 (PEG8000) al 4% y cloruro de sodio al 3% (NaCl) a 4° C durante 30 minutos, seguido de centrifugación. El sobrenadante se eliminó, y el fago precipitado se suspendió en 1 ml de PBS. El proceso de selección descrito anteriormente se repitió usando el fago suspendido como una biblioteca, amplificando/concentrando de este modo los clones específicos del antígeno.

Para seleccionar un anticuerpo que se une al sitio de unión de Notch 1 de la proteína DLL4 humana, se realizó una selección cruzada de la proteína DLL4 humana y un fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) correspondiente a una región específica de DLL4 humana por rondas. Luego, las células se colocaron en placas y se cultivaron en medio de agar LB-carbenicilina que contenía un gen de anticuerpo para obtener colonias individuales, que luego fueron inoculadas e incubadas en 400 μl de medio SB-carbenicilina, después de lo cual la expresión de la proteína de tipo scFv en el periplasma de *e. coli* se indujo mediante la adición de IPTG. Las células de *E. coli* se suspendieron en solución de TES (Tris, EDTA, sacarosa) y se dejaron reposar a 4°C durante 1 hora. Luego, la suspensión se centrifugó para extraer el periplasma, que se usó luego para examinar la unión entre el antígeno de DLL4 humano recombinante y el scFv mediante una técnica ELISA.

El scFv unido se detectó usando un anticuerpo anti-HA de peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato de tetrametilbencidina (TMB). Se secuenciaron los clones de anticuerpos específicos del antígeno detectados. Los resultados de la secuenciación del scFv analizado se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

	Secuencias de aminoácidos	CDR1	CDR2	CDR3
5	EVQLLES GGG LVQP GGS LRL			
	SCAASGFTFSDYAMSWVRQA	GFTFSDY	WIYSGSG	ADWPF
	PGKCLEWVSWIYSGSGNKYY	AMS	NKYYAD	Y
10	ADSVKGRFTISRDN SKNTLY	(SEQ ID NO:2)	SVKG	(SEQ ID NO:4)
	LQMNSLRAEDTAVYYCARAD		(SEQ ID NO:3)	
15	WPFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:8)			
20	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI	TGSSSNIG		GTWDYS
	SCTGSSSNIGSNDVTWYQQL	SNDVT		LSAYV
25	PGTAPKLLIYADSKRPSGVP	(SEQ ID NO:5)	ADSKRPS (SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO:7)
	DRFSGSKSGTSASLAISGLR			
30	SEDEADYYCGTWDYSL SAYV			
	FGCGTKLTVL (SEQ ID NO:9)			

El anticuerpo anti-DLL4 que tiene la secuencia anterior se denominó "MLCK-2".

Ejemplo 1-4: Preparación de un anticuerpo de objetivo doble (anticuerpo biespecífico) que se dirige a DLL4 y VEGF

El anticuerpo de tipo scFv de unión a DLL4 humano preparado en el Ejemplo 1-3 se conectó a un anticuerpo de tipo IgG de Avastin mediante el uso de un conector, preparando de este modo un vector de expresión de proteína de objetivo doble que también puede unirse a VEGF humano (FIG. 1b).

La proteína de objetivo doble preparada tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada (cadena pesada BsAb de VEGF-DLL4) de la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 20. La cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2, la CDR2 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 3, y la CDR3 de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 5, la CDR2 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 6, y la CDR3 de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 7.

Para producir un anticuerpo en células CHO usando el vector de expresión de la proteína de objetivo doble, el gen de interés se transfectó en células animales usando un polímero para aumentar la eficiencia de administración génica intracelular, y las células se cultivaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml (Corning Costar) a un volumen de 200 ml por botella hasta un volumen total de 1 l. Se incubó 1 l de una mezcla de medio RPMI (Invitrogen Corp.) que contenía suero bovino fetal ultra bajo en IgG (Invitrogen Corp.) y medio de cultivo de células CHO en una incubadora (Sanyo) durante 4 días, produciendo de este modo una proteína recombinante. El medio de cultivo celular se recogió y se centrifugó para separar el sobrenadante que contenía la proteína recombinante de las células suspendidas, y el sobrenadante se filtró una vez a través de un filtro de vacío de 0,22 μ m (Millipore).

Para la purificación de anticuerpos, el anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb se purificó primero a partir del medio de cultivo usando una columna de proteína-A Sefarosa recombinante (Hitrap MabSelect Sure, 5 ml, GE healthcare). Específicamente, el medio de cultivo filtrado se cargó en la columna de proteína A Sefarosa recombinante. La columna se lavó con un volumen de 20 veces de Tris-Cl 50 mM (pH 7,5), con tampón de NaCl 100 mM y se lavó con un volumen de 10 veces de tampón de citrato de Na 50 mM (pH 5,0) para eliminar las impurezas. El anticuerpo se eluyó con tampón de Na-citrato 5 mM NaCl 10 mM (pH 3,4) y se neutralizó con un tampón de Tris-HCl 1M (pH 8,0).

Para la segunda purificación, se eliminó una agregación del anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb usando HiLoad TM 26/60 Superdex 200 Prep grado GL (GE Healthcare). La columna se equilibró con un

volumen 2 veces del tampón de Na-fosfato 50 mM (pH 6,0), L-Arg 20 mM y luego se permitió que el anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb purificado se separara de acuerdo a su tamaño.

Las fracciones purificadas usando la columna se analizaron por SDS-PAGE (FIG. 2), y las fracciones positivas se concentraron por centrifugación usando un concentrador Amicon Ultra (30.000 MWCO, Millipore). Usando el mismo concentrador, se realizó la sustitución del tampón con el tampón fosfato y la concentración. Finalmente, el anticuerpo se esterilizó por filtración a través de un filtro de jeringuilla que tenía un tamaño de poro de 0,22 μm , y se midió la absorbancia (A_{280}) del mismo para determinar la concentración de anticuerpo.

Ejemplo 2: Análisis de las afinidades de unión de la proteína de objetivo doble para DLL4 y VEGF mediante ELISA

Las afinidades de unión de las proteínas de objetivo doble para DLL4 y VEGF se evaluaron usando un ensayo de competición de solución basado en ELISA. Específicamente, se recubrió una placa de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plate, NUNC, Rochester, NY) con 50 ng/ml de hVEGF (R&D Systems, cat: 293-VE) y 200 ng/ml de rhDLL4 (R&D Systems, cat.: 1506-D4/CF) en una cantidad de 100 μl por pocillo a 4° C durante la noche, y se bloquearon sitios de unión no específicos con BSA (albúmina de suero bovino) durante 2 horas. El anticuerpo en la placa de microtitulación de 96 pocillos se diluyó 1/5 veces de 128 nM y 64 nM, y se añadieron 100 μl de cada una de las diluciones a cada pocillo de la placa recubierta con proteínas de hDLL4 y hVEGF. Luego, la placa se incubó durante 2 horas y se lavó cinco veces con PBS que contenía tween 20 al 0,05%. Para detectar el anticuerpo unido a la placa, se diluyó un anticuerpo anti-Fab conjugado con HRP (Pierce, cat: 31414) a una proporción de 1:40.000, se transfirió a la placa de microtitulación de 96 pocillos lavada, y luego se dejó que reaccionar a 37° C durante 1 hora. Después de la reacción, se realizó el desarrollo del color usando un sustrato colorimétrico (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Sigma-Aldrich). La reacción enzimática se detuvo usando 0,5 mol/l de ácido sulfúrico. Se midió la absorbancia a 450 nm usando SpectraMax 190 (dispositivo molecular).

Como se puede ver en la FIG. 3, se demostró que la proteína de objetivo doble de la presente invención se unía específicamente a sus objetivos (VEGF y DLL4).

Ejemplo 3: Ensayo de la constante de disociación de equilibrio (KD) de la proteína de objetivo doble de DLL4/VEGF para DLL4 y VEGF

La proteína de objetivo doble (anticuerpo biespecífico) purificada en el Ejemplo 1 se denominó "Avastin-DLL4 BsAb", y las afinidades del anticuerpo purificado para los antígenos se analizaron de la siguiente manera. Para examinar la diferencia en las afinidades de unión del anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb para DLL4 y VEGF, se realizó un ensayo BIACORE.

Específicamente, se usó Biacore T200 en el análisis SPR y se usó HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0,15%) como tampón de ejecución. La preparación de la superficie se realizó usando una herramienta de inmovilización del objetivo de preparación de la superficie de un programa asistente (condición: 25° C, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$). Los ligandos (hVEGF y hDLL4) se diluyeron en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) hasta concentraciones finales de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente, y luego se inmovilizaron en la superficie del chip CM5 por un nivel de inmovilización de objetivo para cada uno grupo de prueba. En el proceso de inmovilización, se incluyeron dos celdas de flujo como un conjunto en el que la primera y la tercera celda de flujo se establecieron como un espacio en blanco, la segunda celda de flujo tiene hVEGF inmovilizado en su superficie, y la cuarta celda de flujo se estableció como hDLL4 en el presente experimento. La primera y la tercera celdas de flujo actuaron como una referencia para tener en cuenta la variabilidad experimental debida a las uniones no específicas y los efectos del tampón, y en el análisis, se usaron valores de RU restados (Fc2-Fc1 y Fc4-Fc3) como resultados experimentales. El anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb que se une a hVEGF y hDLL4 se diluyó en un tampón de ejecución hasta una concentración molar final de 100 nM, se diluyeron en serie 1/2 veces, y se analizó cada una de las 5 diluciones. La muestra a analizar se preparó para que tuviese una alta pureza y una alta concentración, suficiente para diluirse más de 100 veces como mínimo, minimizando de este modo el efecto del tampón. Todo el análisis se realizó usando un programa asistente, se incluyeron duplicados de selección para cada muestra y se incluyó un paso de regeneración entre cada paso del análisis, de tal manera que el estándar del experimento permaneciera constante.

Los resultados experimentales se analizaron mediante el software Biaevaluation versión 4.0. En este momento, para determinar los valores de RU (Fc2-Fc1 y Fc4-Fc3), el valor de referencia se estableció en cero, el valor medido en una parte de inyección de tampón (analito, 0 nM) se restó de un sensograma completo. Luego, el valor de RU resultante se analizó mediante un modelo de unión bivalente para determinar una afinidad de unión. Los factores a analizar incluyen k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), k_d (s^{-1}) y K_D (M). Para ser específicos, k_a es una constante de asociación que demuestra una afinidad de unión (reconocimiento), y k_d es una constante de disociación que demuestra estabilidad.

La Tabla 2 siguiente muestra los resultados de analizar la afinidad de unión de la proteína de objetivo doble para hVEGF, y la Tabla 3 a continuación muestra los resultados de analizar la afinidad de unión de la proteína de

objetivo doble para hDLL4.

Tabla 2

Anticuerpo	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D
Avastin-DLL4 BsAb	1.34E04	1.68E-06	1.26E-10

Tabla 3

Anticuerpo	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D
Avastin-DLL4 BsAb	1.94E04	5.87E-04	3.02E-08

Como puede verse en las Tablas 2 y 3 anteriores, la constante de disociación de equilibrio $K_D(M)$ se calculó dividiendo k_d con k_a (k_d/k_a). Los resultados del análisis de la afinidad de unión para hVEGF indicaron que el valor de K_D fue de aproximadamente 0,126 nM, que es similar a la constante de disociación en equilibrio de Avastin IgG (FIG. 4a y Tabla 2), y los resultados del análisis de la afinidad de unión para hDLL4 indicaron que el valor de K_D fue de aproximadamente 30 nM (FIG. 4b y Tabla 3). Esto sugiere que la afinidad de unión de la proteína de objetivo doble de la presente invención para cada uno de los antígenos se mantiene en un nivel alto sin interferencia.

Ejemplo 4: Ensayo del efecto de neutralización de la proteína de objetivo doble DLL4/VEGF

El efecto de neutralización del anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb se evaluó usando un ensayo de competición basado en ELISA. Específicamente, cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plate, NUNC, Rochester, NY) se recubrió con 100 μl de 500 ng/ml de proteína de hNotch-1-hFc (R&D Systems) (diluída en PBS) a 4° C durante la noche, y luego se trató con BSA durante 2 horas para bloquear los sitios de unión no específicos.

El anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb (proteína purificada) en la placa de microtitulación de 96 pocillos se premezcla con diluciones en serie de proteína antigénica (DLL4-His humano, 600 ng/ml) a una concentración de anticuerpo que varía de 0 nM a 140 nM. La mezcla antígeno/anticuerpo se incubó durante 30 minutos y luego se transfirió a una placa de microtitulación recubierta con anterioridad con la proteína hNotch-1 del receptor DLL4 (50 ng/pocillo) para medir el anticuerpo libre. Luego, la placa se incubó durante 2 horas y se lavó cinco veces con PBS que contenía tween 20 al 0,05%. Para detectar el antígeno de DLL4 unido a la placa, se diluyó un reactivo de anticuerpo policlonal IgG anti-ratón His conjugado con HRP (Roche applied science) a una proporción de 1:800, y la placa de microtitulación lavada se trató con el reactivo de anticuerpo diluido, y luego se dejó reaccionar a 37° C durante 1 hora. Luego, se realizó el desarrollo del color con un sustrato colorimétrico (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Sigma-Aldrich Co.) y la reacción enzimática se detuvo usando 0,5 mol/l de ácido sulfúrico. Se midió la absorbancia a 450 nm y los resultados de la medición se muestran en la FIG. 5. La cantidad de anticuerpo requerida para lograr una disminución del 50% en DLL4-His humano unido a proteína Notch 1-hFc recubierta en placas (IC_{50}) se muestra en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

Clon	IC_{50} (nM)
VEGF-DLL4 BsAb	1.12

Como se puede ver en la Tabla 4 anterior, la proteína de objetivo doble de la presente invención mostró un bajo valor de IC_{50} bajo de 1,12 nM para DLL4, sugiriendo que tiene actividad inhibidora de DLL4 comparable a la del anticuerpo anti-DLL4 solo.

Ejemplo 5: Mapeo de epítomos por reacción de reticulación y espectrometría de masas

Para identificar un epítipo conformacional, que consiste de una pluralidad de secuencias discontinuas pero que conformacionalmente forma una superficie molecular única, se usó una técnica para determinar las posiciones de las reacciones de reticulación mediante reacciones de reticulación y espectrometría de masas.

Ejemplo 5-1: Formación de complejo reticulado

Se mezclaron entre sí el ligando 4 tipo delta humano de proteína antigénica (DLL4 humana, hDLL4, R&D Systems) y el MLCK2 del Ejemplo 1-3 a una relación molar de 2:1, y luego se añadió un reticulante K200 (CovalX AG) a la misma a una concentración final de 0,2 mg/ml. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas para formar un complejo antígeno-anticuerpo, y luego se analizó el peso molecular del producto de reacción usando un espectrómetro Ultraflex II MALDI ToF (Bruker Daltonics). Como se muestra en la FIG. 6, se pudo ver que cuando se usó el reticulante, se formaron complejos 1:1 y 2:1 entre el DLL4 humano y el anticuerpo MLCK2,

a diferencia de un experimento de control en el que no se usó ningún reticulante. Sin embargo, se pudo ver que cuando se permitió que el anticuerpo DLL4 o MLCK2 humano solo reaccionara con el reticulante, no se detectó ningún multímero o complejo, sugiriendo que la formación del complejo de anticuerpo humano DLL4/MLCK2 resulta de una reacción específica entre DLL4 y MLCK2.

Ejemplo 5-2: Formación de fragmentos por proteasa

Para identificar los fragmentos de péptidos reticulados, se mezclaron d0-DSS (disuccinimidil suberato) y d12-DSS entre sí a una proporción de 1:1 y se disolvieron en DMF para elaborar 2 mg/ml de una solución. La solución se añadió a una mezcla 2:1 de DLL4 y MLCK2 a una concentración final de 0,2 mg/ml y se sometió a una reacción de reticulación a temperatura ambiente durante 3 horas. El producto de la reacción se modificó por reducción y alquilación usando DTT (ditiotritol) y yodoacetamida para una degradación efectiva, y se fragmentó usando una proteasa como tripsina, α -quimotripsina o proteasa ASP-N. Los fragmentos producidos se analizaron mediante un sistema de cromatografía nano-líquido Ultimate 3000 (Dionex) y un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo), y los datos de la espectrometría de masas obtenidos se analizaron mediante el software Xquest (versión 2.0) y el software Stavrox (versión 2.1) para detectar parejas de péptidos reticulados. Como resultado, como se muestra en la Tabla 5 siguiente, se pudieron detectar las parejas de péptidos formadas por reticulación entre hDLL4 y MLCK2.

Las posiciones en DLL4 humano, en las que se produjo una reacción de reticulación, fueron los residuos de aminoácidos 59, 63, 64 y 110 de la secuencia de aminoácidos de DLL4 humano. Dos fragmentos, que son una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 58° a 65° [FRVCLKHF] (SEQ ID NO: 22) y una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 110-115° [TWPGTGTF] (SEQ ID NO: 23), constituyen una superficie molecular continua en un modelo de dominio DLL4 C2 humano (27-174) como se muestra en la FIG. 7. Por tanto, podría determinarse que las dos secuencias son el epítipo de DLL4 humano para el anticuerpo MLCK2.

Tabla 5

Secuencia	Proteína 1	Proteína 2	Seq. Proteína 1	Seq. Proteína 2	Id-Puntuación	nAA1	nAA2	Id en Xquest	Identificación en Stavrox
ADSVKGRF-TWPGTF-a3-b1	MLCK 2 HC	hDLL4	60-67	110-115	13.62	62	110	sí	sí
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a12-b2	MLCK 2 LC	hDLL4	50-62	58-65	11.59	62	59	sí	sí
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a3-b7	MLCK 2 LC	hDLL4	50-62	58-65	9.47	53	64	sí	sí
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a3-b2	MLCK 2 LC	hDLL4	50-62	58-65	6.33	53	59	sí	sí
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a3-b6	MLCK 2 LC	hDLL4	50-62	58-65	6.15	53	63	sí	sí
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a4-b2	MLCK 2 LC	hDLL4	50-62	58-65	5.04	54	59	sí	sí
ADSKRPSGVPDRF-FRVCLKHF-a12-b7	MLCK 2 LC	hDLL4	50-62	58-65	3.87	62	64	sí	sí

Ejemplo 6: Examen del mapa de epítipos por transferencia Western

Se preparó un panel mutante de sustitución de alanina de DLL4 humano de la siguiente manera, en el que cada uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones 64 (histidina), 65 (fenilalanina) y 69 (valina) en la secuencia de aminoácidos de la región de proteína extracelular de DLL4 humana se sustituyó con alanina. Como un vector de expresión para los mutantes de sustitución de alanina, se usó el vector usado en la preparación del antígeno correspondiente a la región específica del dominio extracelular de DLL4 como se describe en el Ejemplo 1-1. Específicamente, el vector comprende un gen correspondiente a los residuos de aminoácidos 27 a 251 de la secuencia de aminoácidos de la región específica de DLL4 humano, y esta región contiene un motivo llamado "DSL (delta/serrate)/lag-2" que se sabe que se une al receptor Notch 1.

Usando una técnica de ADN recombinante estándar, se preparó un vector de plásmido de expresión de mamífero que comprende un promotor de CMV secuencia arriba de un polinucleótido que codifica un fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) del dominio extracelular de DLL4 fusionado con proteína Fc. Para sustituir cada uno de los residuos de aminoácidos 64, 65 y 69 en el vector con alanina, se usó una técnica de ADN recombinante (mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, Agilent), y los mutantes se transfectaron en células animales HEK293E usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se incubaron durante 4 días, después de lo cual se

recuperó el medio de expresión. Como control, se usó una proteína que codifica un fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) del dominio extracelular de DLL4 del tipo salvaje.

Los medios de expresión mutantes incubados durante 4 días se centrifugaron a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos para eliminar el material suspendido, y luego se filtraron a través de una jeringuilla de 0,45 µm. Para el análisis de transferencia Western, el nivel de la proteína en el medio de expresión mutante se cuantificó usando el sistema Octet® (ForteBio) para que se cargara una cantidad uniforme del mutante en el gel SDS. Luego, se cargaron 20 µl de cada uno de los medios de expresión mutantes en cada uno de los dos geles Novex 4-12% Bis/Tris, y se sometieron a electroforesis en gel usando tampón MOPS a 140 V durante 50 minutos. Como control, se usó una proteína que codifica un fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) del dominio extracelular de DLL4 de tipo salvaje. Una vez completada la electroforesis, la banda de proteína se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se realizaron un total de dos procesos. En un proceso, para examinar si se cargaron cantidades uniformes de las proteínas mutantes y de tipo salvaje cuando el fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) del dominio extracelular de DLL4 se cargó en un gel SDS, se unió un anticuerpo Fc anti-humano conjugado con HRP (1:10000) (Pierce Cat: 31413) a la membrana transferida y luego la membrana se lavó tres veces con PBS-T. En el otro método, para examinar las afinidades de unión del anticuerpo MLCK2 a los mutantes, se unió primero el anticuerpo MLCK2 (1 µg/ml) a la membrana transferida, la membrana se lavó tres veces con PBS-T y luego se unió un anticuerpo FAb anti-humano conjugado con HRP (1:10000) a la membrana, seguido de lavado tres veces con PBS-T. Luego, se aplicó el reactivo de detección de transferencia Western ECL de Amersham (GE Healthcare) a la membrana, y la detección de señales se realizó usando ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Como se muestra en la FIG. 8, los resultados del análisis de transferencia Western indicaron que las proteínas mutantes que codifican el fragmento de delección (residuos de aminoácidos 27 a 251) del dominio extracelular de tipo salvaje y DLL4 se cargaron en una cantidad uniforme. Además, cuando se examinaron las afinidades de unión del anticuerpo MLCK2 para los mutantes, se pudo observar que, para el aminoácido mutante en la posición 64, se perdió la afinidad de unión del anticuerpo MLCK2, y para el aminoácido mutante en la posición 65, la afinidad de unión del anticuerpo MLCK2 disminuyó significativamente. Además, se mostró que el mutante de aminoácido en la posición 69 no influyó en la afinidad de unión del anticuerpo MLCK2.

Ejemplo 7: Análisis del efecto del anticuerpo de objetivo doble DLL4/VEGF sobre la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

Para analizar el efecto del anticuerpo de objetivo doble, que se une a DLL4 y VEGF, sobre la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), se usaron en este experimento células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) adquiridas de Lonza.

Para el cultivo de HUVEC, e recubrió un matraz T (Nunc) con tampón PBS (Gibco) que contenía 1% de gelatina (Sigma) a temperatura ambiente durante 4-6 horas, seguido de lavado con PBS. Se usó EBM-2 que contenía EGM-2 Single Quot (Lonza) como medio de cultivo, la densidad de un cultivo celular se mantuvo por debajo del 80% y las células se cultivaron a 37° C en una incubadora de CO₂ al 5%. Para este experimento se usaron las células antes del pase 6. Se realizó un ensayo de proliferación de HUVEC de la siguiente manera. Primero, para preparar una placa recubierta con hDLL4, un día antes de realizar el experimento, se diluyó rhDLL4 (R&D Systems) en un tampón de carbonato a una concentración final de 1 mg/ml en una placa de 96 pocillos (BD) y se inocularon 100 µl del rhDLL4 diluido en cada pocillo y la placa se incubó a 4° C durante la noche. Además, las HUVEC se cultivaron en medio mínimo EBM-2 suplementado con FBS al 0,1% durante 24 horas para minimizar el efecto del suero. En el primer día del experimento, cada pocillo de la placa recubierta con rhDLL4 se lavó dos veces con PBS, y para cada grupo de prueba, cada uno de hVEGF (50 ng/ml) y anticuerpos (Avastin: 20 mg/ml; anticuerpo anti-DLL4 solo: 20 mg/ml; anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb: 26 mg/ml) se diluyó con el medio mínimo de EBM-2 y luego se añadió a cada pocillo por triplicado, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las HUVEC privadas de alimento durante 24 horas se disociaron en células individuales, y se diluyeron a 4 x 10³ células/pocillo con medio mínimo EBM-2. Las células diluidas se inocularon en el pocillo tratado con el anticuerpo y se incubaron en una incubadora de CO₂ al 5% a 37° C durante 96 horas. Después de la finalización de la proliferación celular, se añadieron 10 µl de kit-8 de recuento de células (CCK-8, Dojino) a cada pocillo y la placa se incubó en una incubadora de CO₂ al 5% a 37° C durante 5 horas. Usando SpectraMax 190 (Molecular Devices), se midió la absorción de la muestra a 450 nm y se compararon los niveles de proliferación celular entre diferentes grupos de prueba.

Como se muestra en todas las figuras (grupo tratado con PBS) de la FIG. 9, cuando se activa la señalización de DLL4/Notch, la proliferación de células endoteliales vasculares se inhibirá en aproximadamente un 30%, al contrario del caso en el que la proliferación de células endoteliales vasculares se activa por VEGF. En los mecanismos *in vivo*, como se ha descrito anteriormente, se sabe que el anticuerpo VEGF inhibe la angiogénesis de los tumores para inhibir de este modo el crecimiento y la metástasis de los tumores, mientras que el anticuerpo DLL4 induce la producción excesiva de vasos sanguíneos anormales (vasos sanguíneos inactivos) en los tumores para inhibir de este modo el crecimiento de tumores. Se puede decir que los resultados en la FIG. 9 reflejan los diferentes

mecanismos angiogénicos de VEGF y DLL4 *in vitro*.

Como puede verse en la FIG. 9a, cuando el VEGF y su receptor, y la vía de señalización de VEGFR, que desempeñan un papel importante en la proliferación de células endoteliales vasculares, se tratan con el anticuerpo dirigido a VEGF (Avastin), la proliferación de células endoteliales vasculares se inhibió de una manera dependiente de la concentración independientemente de la presencia o ausencia de DLL4. Sin embargo, como se muestra en la FIG. 9b que muestra los resultados experimentales obtenidos por el tratamiento con el anticuerpo dirigido a DLL4 solo, en el grupo experimental en el que no estaba presente DLL4, la concentración del anticuerpo no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación de células endoteliales vasculares, y en el grupo experimental en el que DLL4 estaba presente, la proliferación de células endoteliales vasculares se produjo de nuevo de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo dirigido a DLL4. En el caso en el que se realizó el tratamiento con la proteína de objetivo doble, en el grupo experimental en el que no estaba presente DLL4, la proteína de objetivo doble mostró un efecto inhibitor de la proliferación similar al del tratamiento con el anticuerpo Avastin (FIG. 9c; barras negras), pero en el grupo experimental en el que estaba presente DLL4, se redujo el efecto inhibitor de la proliferación de la proteína de objetivo doble (FIGS. 9a y 9c; barras blancas).

Debido al hecho de que el grupo tratado con el anticuerpo dirigido a DLL4 no mostró un efecto inhibitor de la proliferación comparable al del tratamiento con el anticuerpo dirigido a VEGF solo, puede verse que el anticuerpo de objetivo doble de la presente invención inhibe efectivamente tanto la vía de señalización de VEGF como de DLL4.

Ejemplo 8: Análisis de las actividades inhibitoras del anticuerpo de objetivo doble DLL4/VEGF sobre las vías de señalización DLL4/Notch y VEGF/VEGFR

Para examinar las actividades inhibitoras del anticuerpo de objetivo doble, que se une a DLL4 y VEGF, sobre las vías de señalización de DLL4/Notch y VEGF/VEGFR, se usaron HUVEC de acuerdo con el mismo método usado en el Ejemplo 4. Específicamente, un día antes de realizar el experimento, se diluyó un DLL4 humano recombinante (rhDLL4, R&D Systems) con tampón de carbonato a una concentración final de 1 mg/ml, y luego se añadieron 1 ml/pocillo de rhDLL4 diluido a una placa de 6 pocillos (BD) y se incubó a 4° C durante la noche. Para un grupo de control que no se trató con rhDLL4, solo se añadió 1 ml/pocillo de tampón de carbonato a la placa y se incubó a 4° C durante la noche. Al día siguiente, la placa recubierta con DLL4 se tomó de un refrigerador a 4° C y se lavó una vez con PBS, y se añadió 1 ml de medio EGM-2 a cada pocillo de la placa. Luego, se añadió a cada pocillo cada uno de los anticuerpos (Avastin: 20 mg/ml; DBZ: 0,08 mM; anticuerpo dirigido a DLL4 solo: 20 mg/ml; anticuerpo dirigido a DLL4 Oncomed solo: 20 mg/ml; anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb: 26 mg/ml). El volumen final de medio en cada pocillo fue de 2 ml y el volumen de anticuerpo añadido fue el doble del volumen del medio. La placa se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante el tratamiento con anticuerpos, se tomó la placa 75T que contenía HUVEC en los pases N° 2 a N° 5, y el medio se retiró de la placa, y luego las células se disociaron en células individuales. A través de centrifugación, las HUVEC se lavaron y se resuspendieron en un medio EGM-2 nuevo. Después de contar las células, las células se diluyeron a 5×10^5 células/ml, y se inoculó en cada pocillo 1 ml de las células y se incubó en una incubadora de CO₂ al 5% a 37° C durante un día. Después de cultivar las HUVEC durante un día, el medio se eliminó de cada pocillo y las células se lavaron una vez con PBS y se trataron con 2 ml de medio mínimo EBM-2 que incluía 0,2% de FBS. Además, cada pocillo se trató con cada una de las mismas concentraciones de anticuerpos (Avastin: 20 mg/ml; DBZ: 0,08 mM; anticuerpo dirigido a DLL4 solo: 20 mg/ml; anticuerpo dirigido a DLL4 Oncomed solo: 20 mg/ml; anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 BsAb 26 mg/ml) que se trataron el día antes, y las células se incubaron a 37° C en una incubadora de CO₂ al 5% durante un día. Luego, cada pocillo que contenía las HUVEC tratadas con cada anticuerpo se trató con 100 ng/ml de hVEGF (R&D Systems) y se incubó a 37° C en una incubadora de CO₂ al 5 % durante 5 minutos. Luego se sacó la placa y se retiró el medio rápidamente. Las células se lavaron una vez con PBS y se añadieron 150 µl de un tampón de lisis celular (NP-40 al 1%, Tris 20 mM, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, EDTA 2 mM, ortohidrato de sodio 1 mM, cóctel inhibitor de proteasa y fosfatasa 1x) a cada pocillo, y la placa se agitó para esparcir el tampón de lisis.

Posteriormente, la placa se colocó en hielo y se recogieron las HUVEC de cada pocillo usando un raspador y se colocaron en un tubo de 1,5 ml y se dejaron reposar en hielo. Cada 5 minutos, el tubo de 1,5 ml que contenía las células se extrajo del hielo, se agitó en vórtice tres veces y se puso hielo nuevamente para la lisis celular. Luego, la muestra se centrifugó a 4° C y 14000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante aislado se transfirió a un tubo nuevo y se pesó. Para el análisis de SDS-PAGE, el sobrenadante se añadió a un tampón de muestra SDS 5x y se hirvió a 100° C durante 10 minutos, seguido del análisis de SDS-PAGE. En este momento, las muestras de proteínas preparadas se procesaron en un gel de bis-TRIS del 4% al 12% y se separaron de acuerdo con su tamaño, y las proteínas separadas se sometieron a transferencia Western con los siguientes anticuerpos (FIG. 10): NICD (Cell signaling), P-ERK (Cell signaling), ERK (Cell signaling), VEGFR2 (Cell signaling), P-VEGFR2 (Cell signaling) y actina (Santa Cruz).

Como se muestra en la FIG. 10, el anticuerpo de objetivo doble de la presente invención podría inhibir las vías de señalización de DLL4/Notch y VEGF/VEGFR a niveles similares a los alcanzados por el anticuerpo dirigido a DLL4 solo y el anticuerpo dirigido a VEGF solo.

Ejemplo 9: Análisis de la actividad anticancerosa del anticuerpo de objetivo doble en el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico SCH humano resistente a Avastin

Como se ha informado en la bibliografía, las células humanas del cáncer gástrico SCH humano tienen resistencia a Avastin. Por tanto, se realizó un experimento sobre el efecto del anticuerpo de objetivo doble en un modelo de xenoinjerto de ratón desnudo con células SCH.

Específicamente, se inocularon células de cáncer gástrico SCH resistentes a Avastin en ratones desnudos hembra, y cuando el tamaño del tumor alcanzó una media de 200 mm³, cada uno de los anticuerpos se administró a los ratones una vez a la semana para confirmar la actividad anticancerosa *in vivo* del anticuerpo de objetivo doble de la presente invención (FIG. 11). En este experimento *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de ratón desnudo, se administró el anticuerpo biespecífico de proteína de objetivo doble Avastin-sustituto de DLL4 de ratón que se une al epítipo de DLL4 de ratón (dominio DSL) igual al epítipo de DLL4 humano (dominio DSL) en lugar del anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 que se dirige a DLL4 humano para demostrar el excelente efecto anticanceroso del anticuerpo de objetivo doble.

Como se muestra en la FIG. 11 Los resultados del experimento *in vivo* indicaron que la proteína de objetivo doble de la presente invención tiene un efecto anticanceroso significativamente aumentado contra las células de cáncer gástrico resistentes a Avastin.

Ejemplo 10: Análisis de la actividad anticancerosa del anticuerpo de objetivo doble en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón A549 humano resistente a Avastin

Se inocularon células A549 en ratones desnudos que luego se trataron con Avastin (2,5 mg/kg/semana) durante 3 meses, obteniendo de este modo células cancerosas A549 resistentes a Avastin cuyo tumor crece sin reducir su tamaño incluso después del tratamiento con Avastin. El tumor se desprendió y luego las células A549 resistentes a Avastin se incubaron *ex vivo* para analizar el efecto del anticuerpo de objetivo doble.

Específicamente, se inocularon células de cáncer de pulmón A549 resistentes Avastin en ratones desnudos hembra, y cuando el tamaño del tumor alcanzó una media de 200 mm³, cada uno de los anticuerpos se administró a los ratones dos veces a la semana para confirmar la actividad anticancerosa *in vivo* del anticuerpo de objetivo doble de la presente invención (FIG. 12). En este experimento *in vivo* que usa células A549 resistentes a Avastin, se administró el anticuerpo biespecífico de proteína de objetivo doble Avastin-sustituto de DLL4 de ratón que se une al epítipo de DLL4 de ratón igual al epítipo de DLL4 humano en lugar del anticuerpo de objetivo doble Avastin-DLL4 que se dirige a DLL4 humano para demostrar el excelente efecto anticanceroso del anticuerpo de objetivo doble.

Como se muestra en la FIG. 12, los resultados del experimento *in vivo* indicaron que la proteína de objetivo doble de la presente invención tiene un efecto anticanceroso significativamente aumentado contra las células de cáncer de pulmón resistentes a Avastin.

<110> HANWHA CHEMICAL CORPORATION

<120> Nueva proteína de objetivo doble que se une específicamente a D114 y VEGF y uso de la misma

<130> OPA14097-PCT

<150> KR 10-2013-0080523

<151> 2013-07-09

<160> 23

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 713

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Avastin-anti-D114 BsAb VH

<400> 1

ES 2 742 855 T3

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

45

50

55

60

65

ES 2 742 855 T3

	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
	210						215					220				
5	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
	225					230					235					240
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Tyr	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
					245					250					255	
10	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				260					265						270	
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
15			275					280					285			
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
	290						295					300				
20	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
	305					310					315					320
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
					325					330					335	
25	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
				340					345					350		
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	His	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
30			355					360					365			
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370						375					380				
35	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
	385					390					395					400
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
40					405					410					415	
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
				420					425					430		
45	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
			435				440						445			
	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	450					455						460				
50	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr
	465					470					475					480
	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile
55					485					490					495	
	Gly	Ser	Asn	Asp	Val	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro
				500					505					510		
60	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
			515					520					525			
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser
65							535					540				

[illegible]

ES 2 742 855 T3

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> anti-DLL4 VH CDR3
 <400> 4
 10
 Ala Asp Trp Pro Phe Asp Tyr
 1 5
 15
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> anti-DLL4 VL CDR1
 <400> 5
 25
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp Val Thr
 1 5 10
 30
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anti-DLL4 VL CDR2
 35
 <400> 6
 Ala Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5
 40
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> anti-DLL4 VL CDR3
 <400> 7
 50
 Gly Thr Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Ala Tyr Val
 1 5 10
 55
 <210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anti-DLL4 VH
 60
 <400> 8
 65

ES 2 742 855 T3

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

45 <210> 9
 50 <211> 110
 55 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 70 <223> anti-DLL4 VL

75 <400> 9

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

115 <210> 10
 120 <211> 10
 125 <212> PRT
 130 <213> Secuencia Artificial

135 <220>

<223> anti-VEGF VH CDR 1

<400> 10

5 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 11

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> anti-VEGF VH CDR 2

15
<400> 11

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

20

Arg

<210> 12

$\langle 211 \rangle$ 9

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> anti-VEGF VH CDR 3

30
<400> 12

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His
1 5

35

<210> 13

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> anti-VEGF VL CDR 1

<400> 13

45 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 14

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> anti-VEGF VL CDR2

<400> 14

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

60

<210> 15

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-VEGF VL CDR3

5 <400> 15

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

10 <210> 16

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> anti-VEGF VH

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

30 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

45 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

50 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Val Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

55

60

65

ES 2 742 855 T3

	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
					165					170					175		
5	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
				180					185					190			
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
			195					200					205				
10	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
	210						215					220					
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
15	225					230					235					240	
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Tyr	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
					245					250					255		
20	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
				260					265					270			
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
25			275					280					285				
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
		290					295					300					
30	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
	305					310					315					320	
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
					325					330					335		
35	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
				340					345					350			
40	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	His	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			355					360					365				
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
		370					375					380					
45	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	385					390					395					400	
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
50					405					410					415		
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
				420					425					430			
55	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
			435					440					445				
	Ser	Pro	Gly	Lys													
60		450															

<210> 17

<211> 214

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> anti-VEGF VL

5 <400> 17

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

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55

<220>
<223> conector peptídico

<400> 18

60

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 19
<211> 45

65

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> conector peptídico

<400> 19
ggaggagggtg gcagcgggtg tggcggcagt cccggggcg gctcc 45

<210> 20
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Avastin-anti-Dll4 BsAb VL

<400> 20

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

<210> 21

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

5 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(685)
<223> DLL4 humano

10 <400> 21

	Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
15	Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	20	25	30	
	Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	35	40	45	
20	Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His	50	55	60	
25	Phe	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Ser	65	70	75	80
	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	85	90	95	
30	Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro	100	105	110	
35	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	115	120	125	
	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala	130	135	140	
40	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln	145	150	155	160
45	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser	165	170	175	
	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn	180	185	190	
50	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys	195	200	205	
55	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser	210	215	220	
	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu	225	230	235	240
60	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His	245	250	255	
65	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys				

ES 2 742 855 T3

				260					265					270			
		Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys
				275					280					285			
5		Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly
			290					295					300				
		Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp
10			305				310					315					320
		Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly
						325					330				335		
15		Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro
					340					345					350		
		Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp
20				355					360					365			
		Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala
			370					375					380				
25		Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu
			385				390					395					400
		Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln
					405						410				415		
30		Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
					420					425					430		
		Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro
35				435					440					445			
		Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys
			450					455					460				
40		Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser
			465				470					475					480
		Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr
					485						490					495	
45		Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe
					500					505					510		
		Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro
50				515					520					525			
		Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu
			530					535					540				
55		Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro
							550					555					560
		Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys
						565					570					575	
60		Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys
					580					585					590		
65		Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln

ES 2 742 855 T3

	595							600				605					
5	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	
	610							615				620					
10	Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	
	625							630				635					
15	Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser	
	645							650				655					
	Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile	
	660							665				670					
	Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val				
	675							680				685					

20 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> hDLL4 epitopo1

<400> 22

30 Phe Arg Val Cys Leu Lys His Phe
1 5

35 <210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hDLL4 epítipo2

40 <400> 23

Thr Trp Pro Gly Thr Phe
1 5

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de objetivo doble que comprende: una proteína que se une específicamente a DLL4, que reconoce un epítipo conformacional de DLL4 que comprende los residuos de aminoácidos 58° a 65° de las secuencias de aminoácidos y 110° a 115° de las secuencias de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de la proteína DLL4 representadas por la SEQ ID NO: 21, y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular),
 5 en donde la proteína que se une específicamente a DLL4 comprende:
 una secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 8 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 9.
 10
2. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 1,
 en la que el anticuerpo que se une específicamente a VEGF comprende:
 15 una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10, la CDR2 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, y la CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12, y
 20 una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13, la CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 14, y la CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15.
3. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 1, en la que la proteína de objetivo doble es una forma en la que la proteína que se une específicamente a DLL4 y el anticuerpo tipo IgG (inmunoglobulina G) que se une específicamente a VEGF están conectados entre sí por un conector.
 25
4. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 3, en la que el conector es un conector peptídico o un conector no peptídico, preferiblemente el conector peptídico tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18.
 30
5. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se une específicamente a VEGF que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17.
 35
6. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo que se une específicamente a VEGF es Bevacizumab.
7. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 1, en donde la proteína de objetivo doble comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20.
 40
8. La proteína de objetivo doble de la reivindicación 1, en donde la proteína que se une específicamente a DLL4 está en forma de anticuerpos de longitud completa, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG o scFv (fragmento variable de cadena sencilla).
 45
9. Un polinucleótido que codifica la proteína de objetivo doble de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.
 50
11. Un transformante en el que se ha introducido el vector de expresión de la reivindicación 10.
12. Un método para producir una proteína de objetivo doble que comprende una proteína que se une específicamente a DLL4 y un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), el método comprendiendo los pasos de: (a) cultivar el transformante de acuerdo con la reivindicación 11 para producir una proteína de objetivo doble; y (b) recuperar la proteína de objetivo doble producida en el paso (a).
 55
13. Una composición que comprende la proteína de objetivo doble de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 60
14. Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar el cáncer, que comprende la proteína de objetivo doble de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de recto,
 65

5 cáncer de boca, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de huesos, cáncer de tejido conectivo, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, leucemia, enfermedad de Hodgkin, linfoma, y cáncer de sangre mieloide múltiple.

16. Una composición para su uso en un método para diagnosticar el cáncer, que comprende la proteína de objetivo doble de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8

Fig. 1a

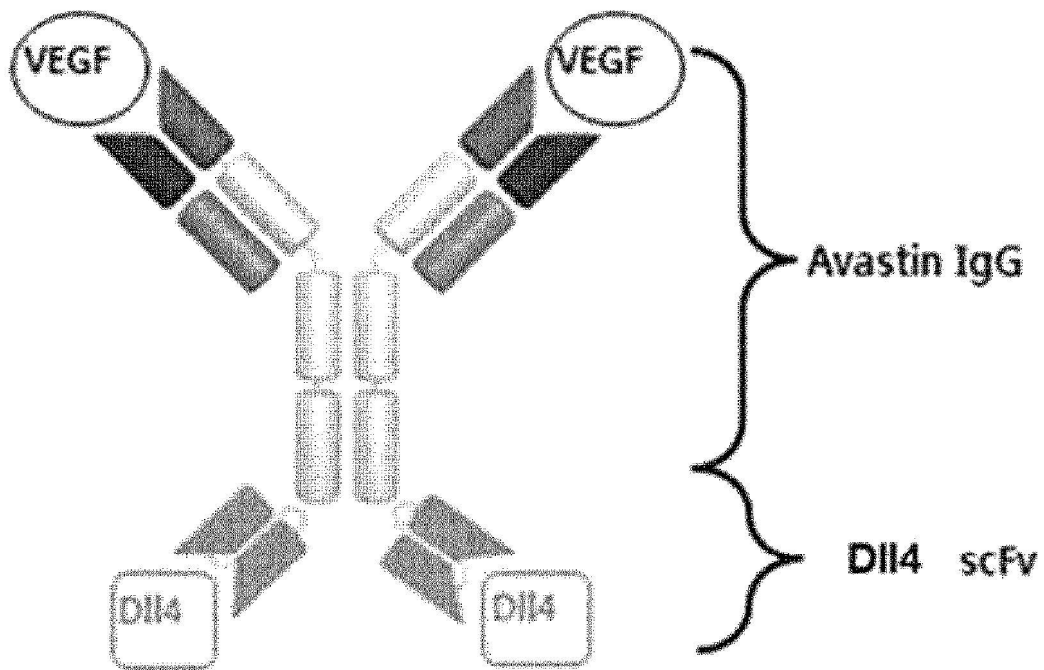


Fig. 1b

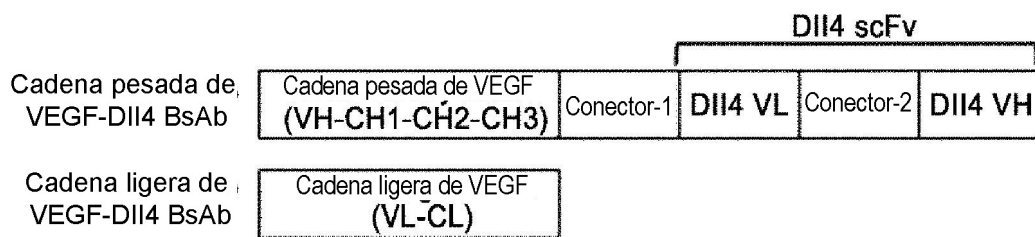


Fig. 2a

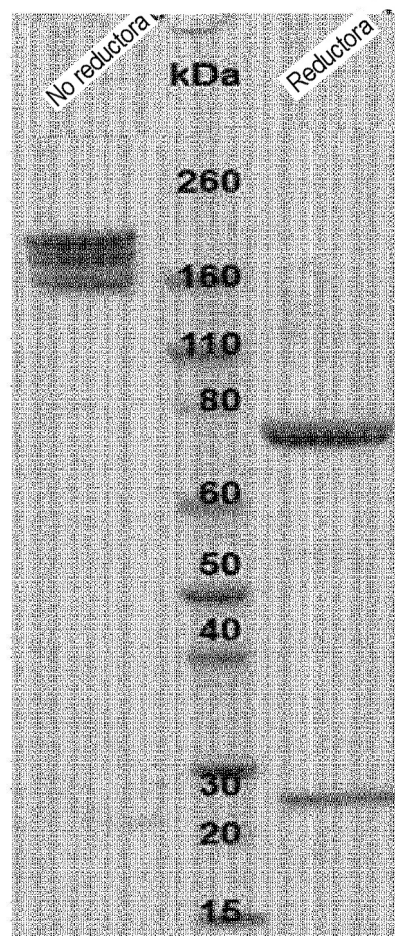


Fig. 2b

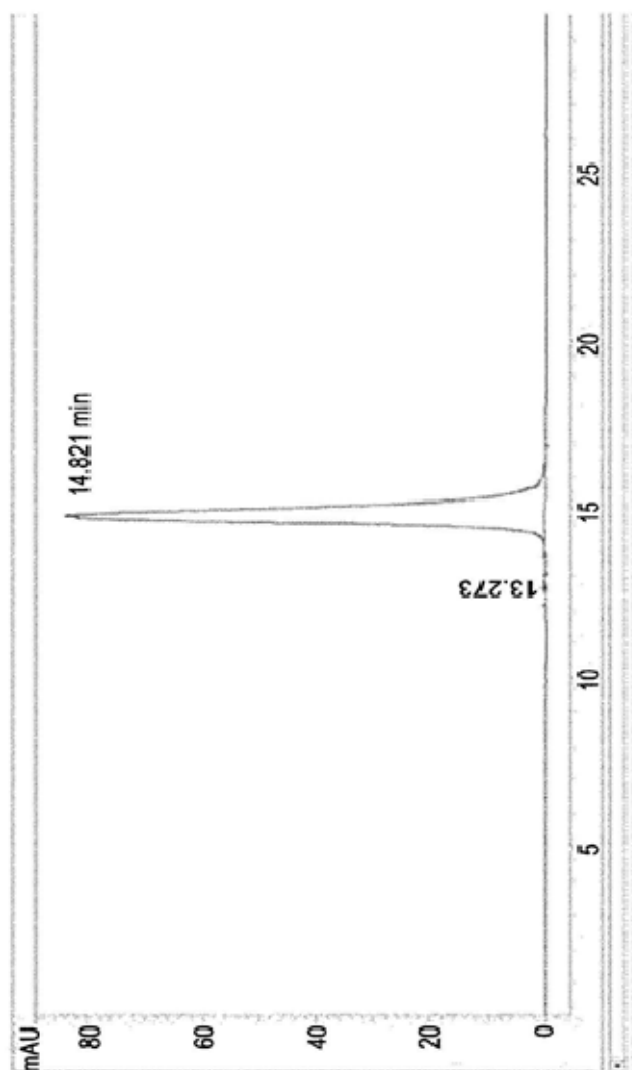
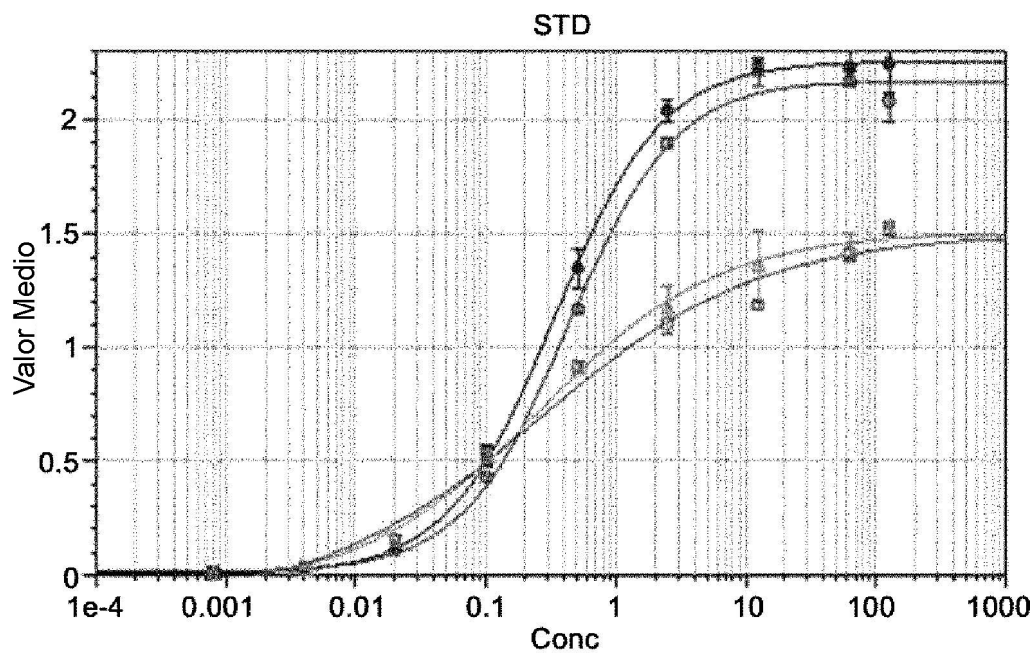


Fig. 3



$$4\text{-P Fit: } y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
● STD (VEGF-Transitoio: Conc vs. Valor Medio)	0.00268	1.05	0.337	2.26	1
○ Gráfico 1 línea celular (VEGF-(grupo GS). Concentración	0.0144	1.07	0.43	2.17	0.997
□ Gráfico 2 l (DLL4-Transitorio: Concentración vs. Media	-0.126	0.506	0.264	1.51	0.987
△ Gráfico 3 línea celular (DLL4-(grupo GS: Concentración	-0.0656	0.623	0.261	1.51	0.997

Opción de Ajuste de Curva - Valor Ponderado Fijado

Fig. 4a

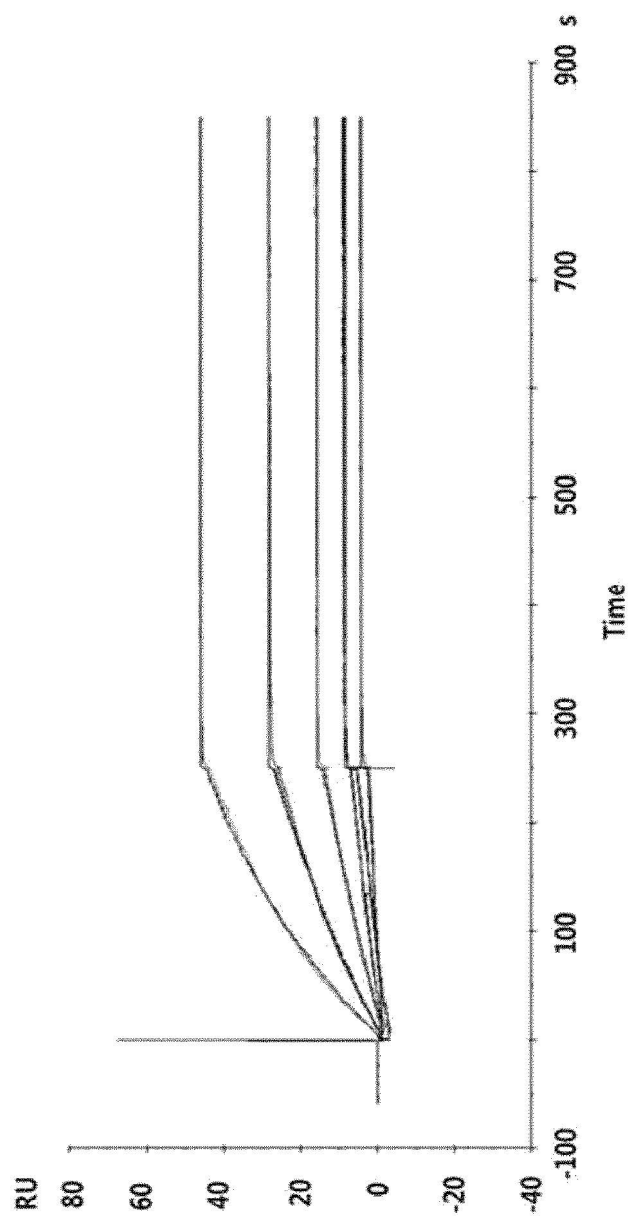


Fig. 4b

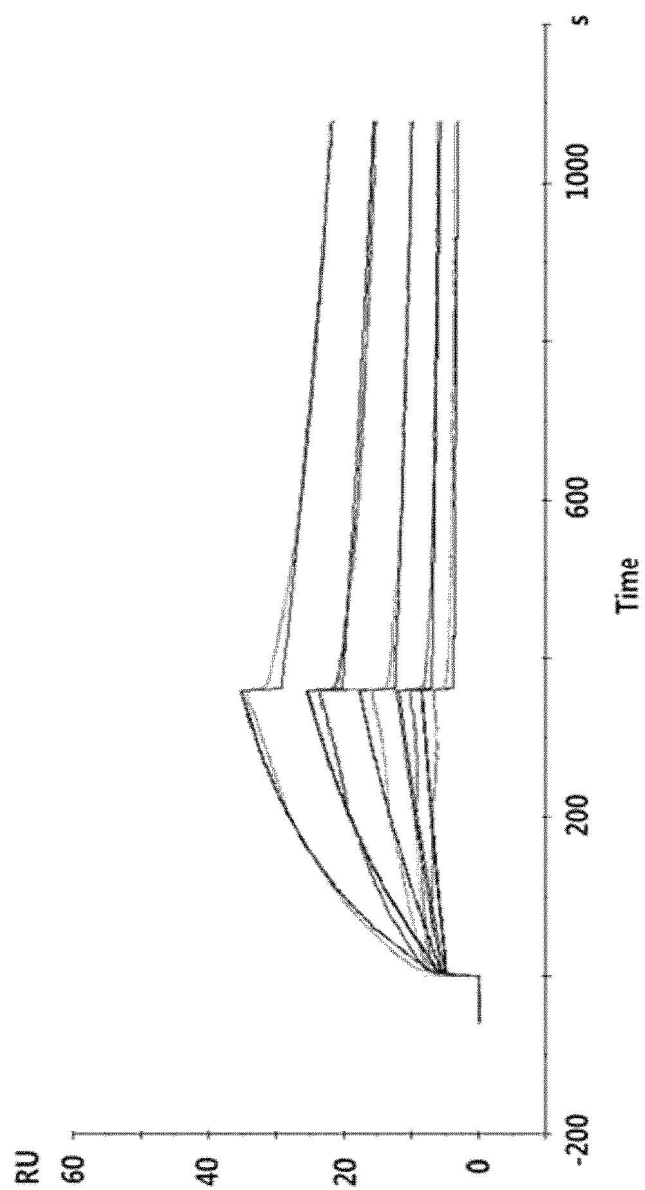


Fig. 5

Ensayo de neutralización de Dll4 humano/Notch humano

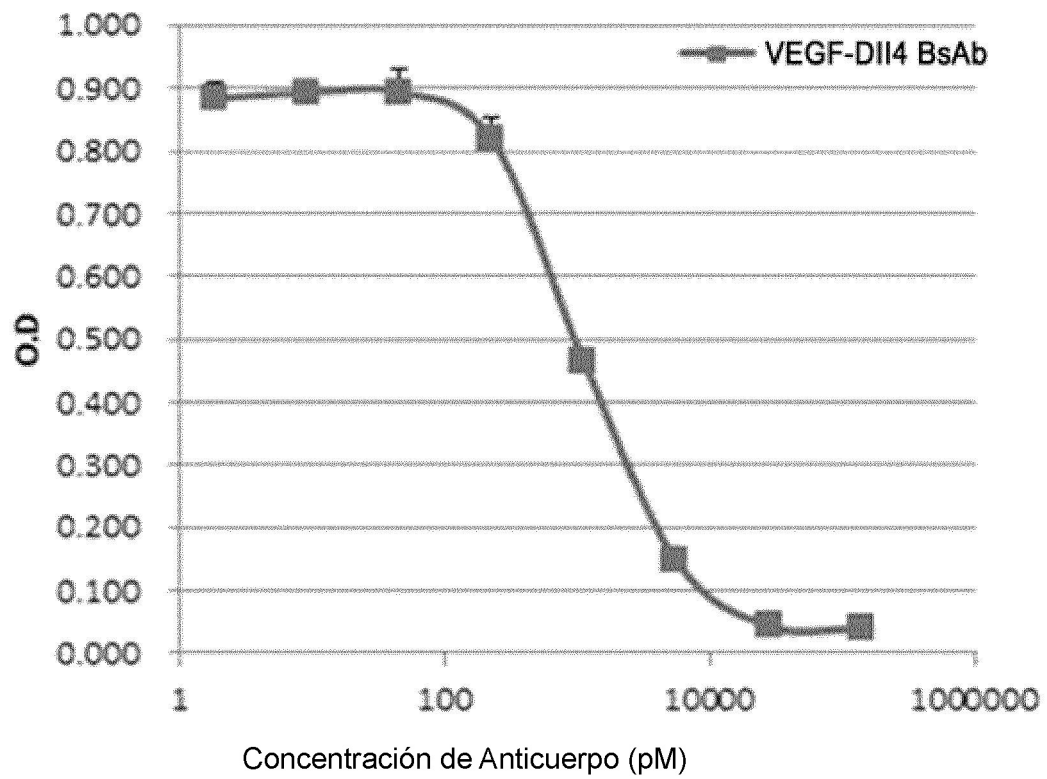


Fig. 6

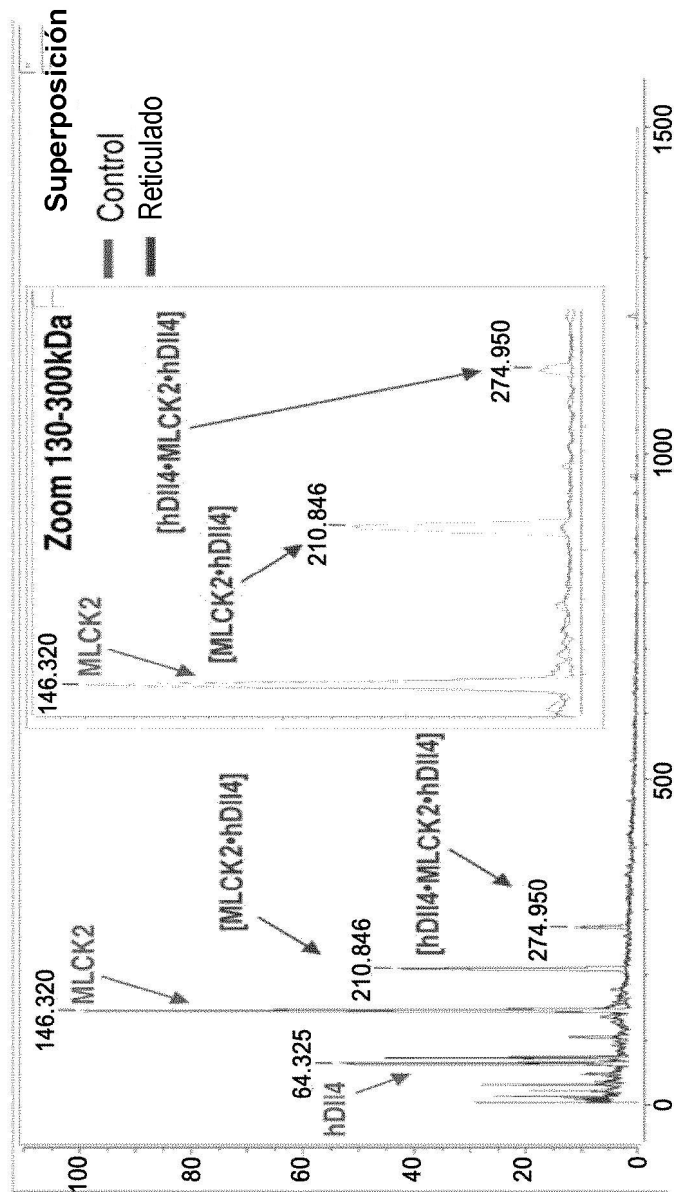


Fig. 7

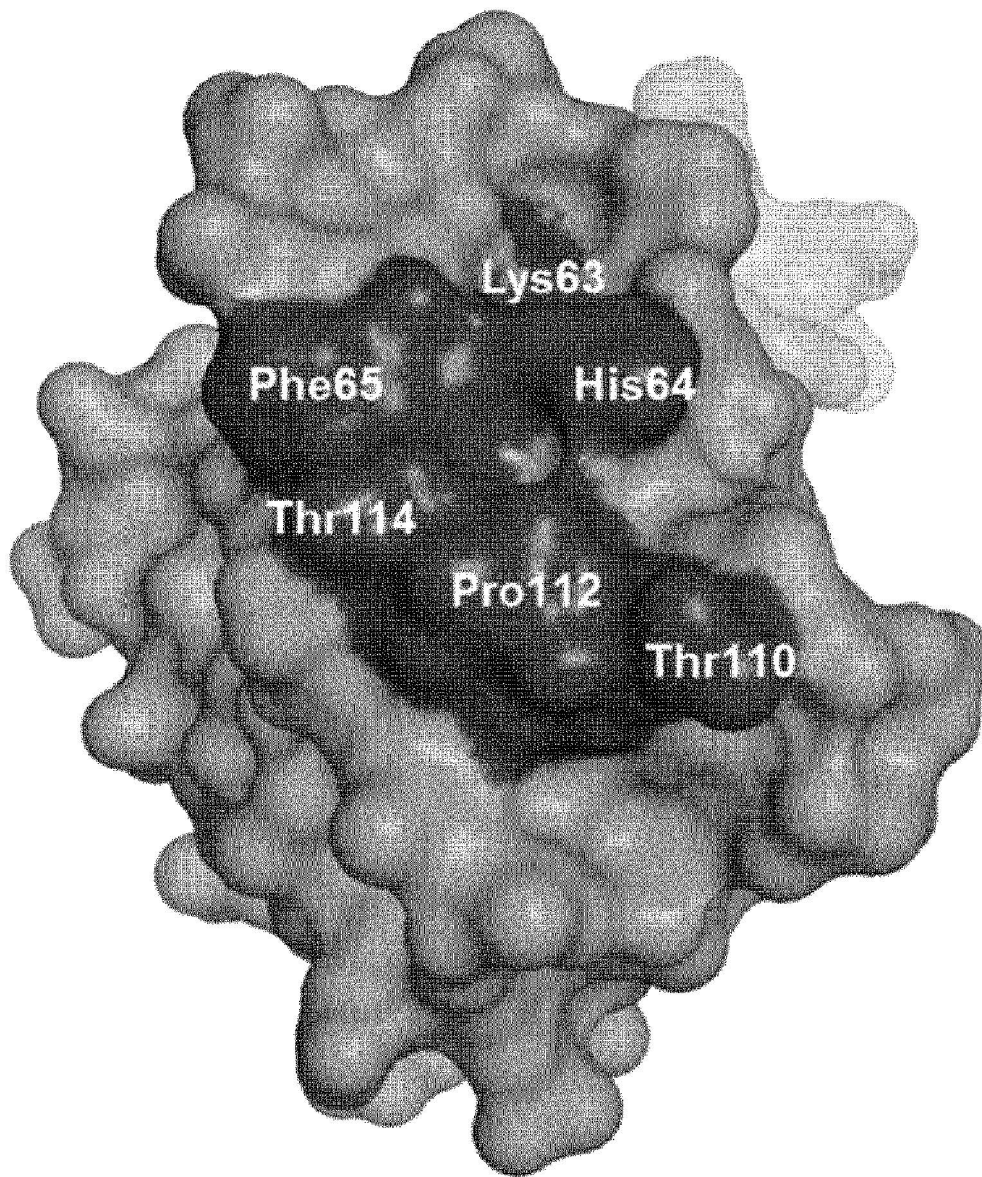


Fig. 8

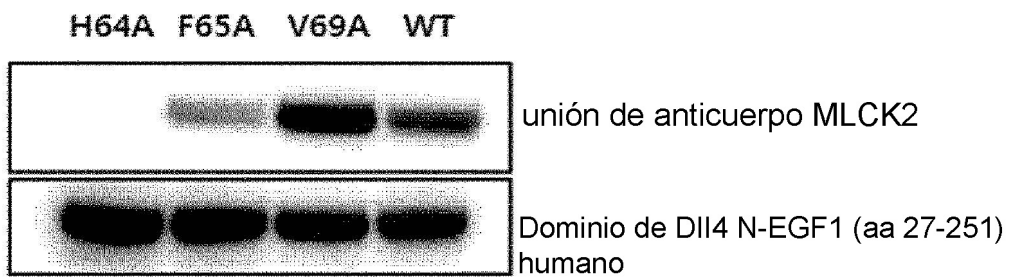


Fig.9a

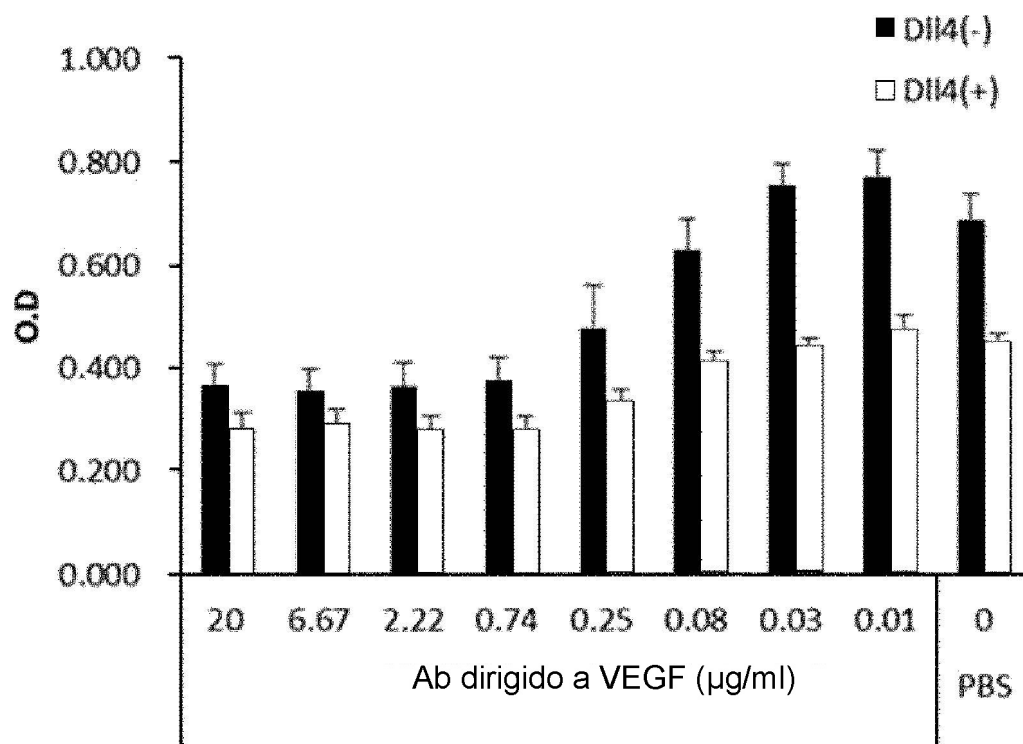


Fig. 9b

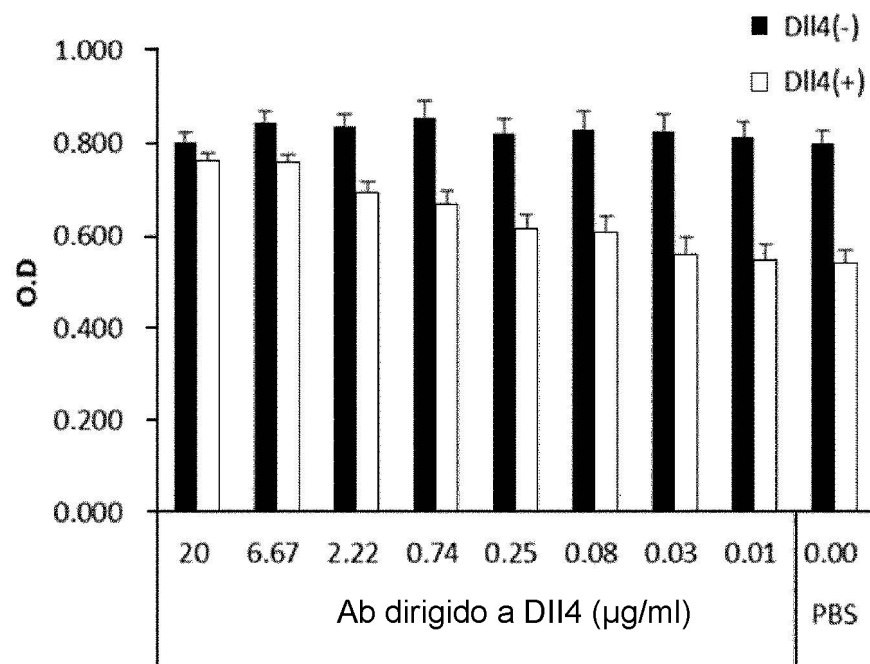


Fig. 9c

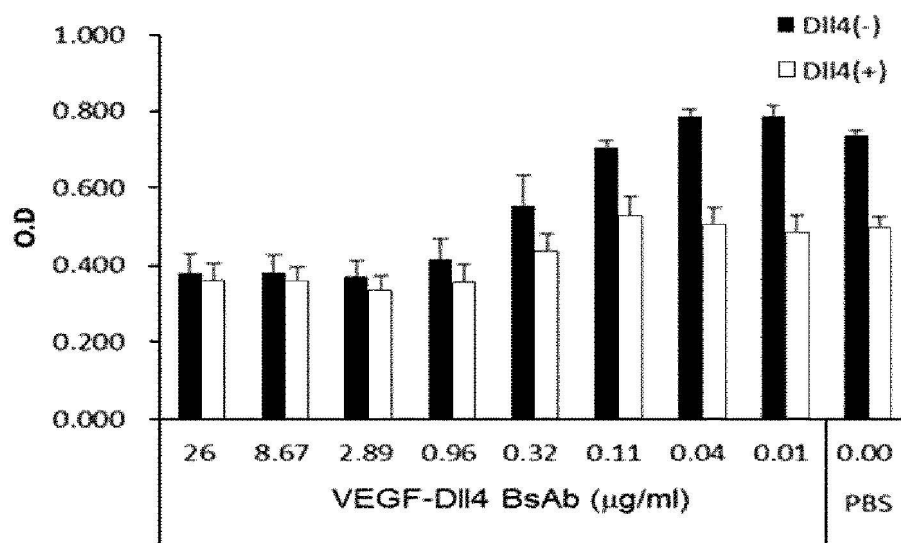


Fig. 10

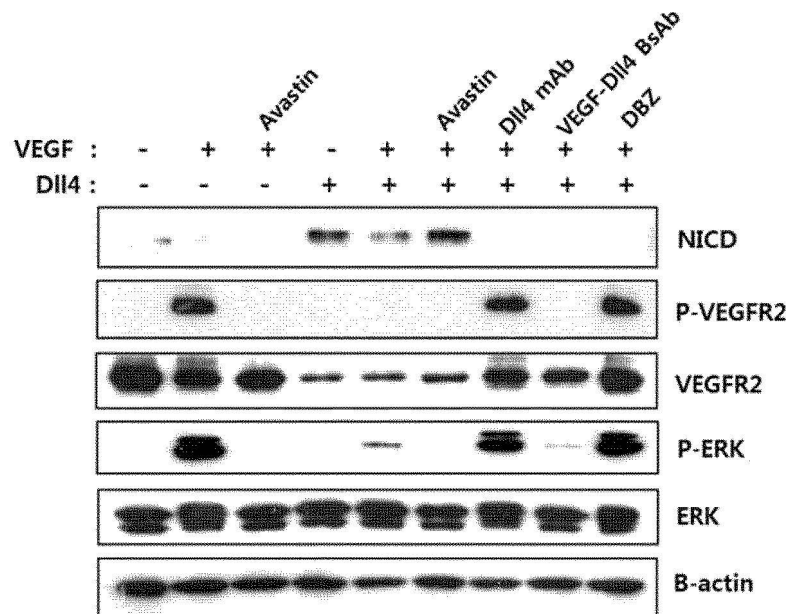


Fig. 11

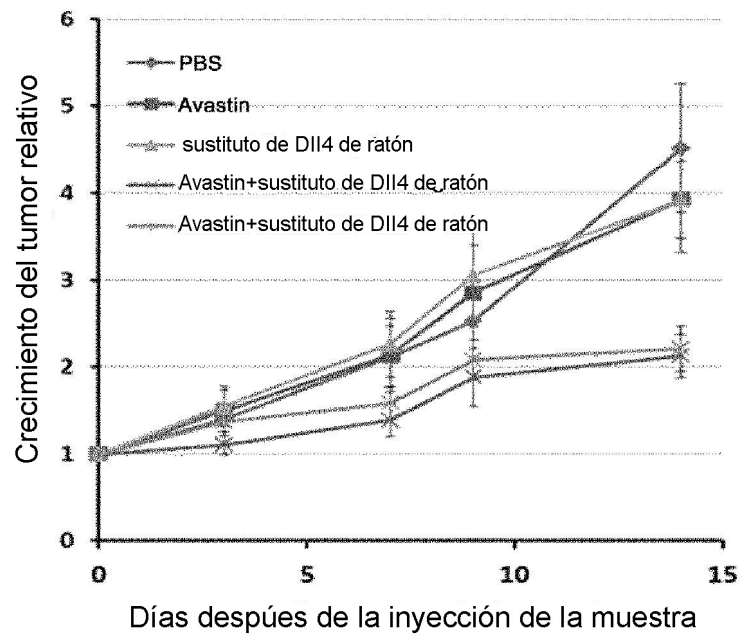


Fig. 12

