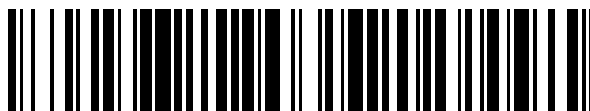


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 672**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2001 E 01973141 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1318830**

54 Título: **Forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o un anticuerpo anti-receptor Notch1 para el tratamiento de cáncer de próstata**

30 Prioridad:

22.09.2000 US 234674 P

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

25.02.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

GAO, WEI-QIANG;

KOEPPEN, HARTMUT;

ROSS, SARAJANE y

SHOU, JIANYONG

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 396 672 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

Forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o un anticuerpo anti-receptor Notch1 para el tratamiento de cáncer de próstata.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** Receptor Notch1 La presente invención se refiere a la activación de la señalización del receptor Notch1 para reducir la proliferación de células cancerosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [0002]** Notch codifica una proteína grande con un único dominio transmembrana, un dominio extracelular grande que tiene muchas repeticiones tipo EGF en tándem. El receptor Notch es una molécula de señalización que funciona en el desarrollo y la diferenciación celular. La familia Notch incluye varios miembros para el receptor, además de ligando. La unión de ligando a un receptor Notch desencadena la escisión del receptor en un sitio en el dominio intracelular (ICD), liberando la forma activada del receptor que luego migra al núcleo.

- [0003]** El documento WO98/20142 describe el uso de compuestos en la modulación de la interacción entre proteínas Notch y sus ligandos y su uso en la terapia de afecciones tales como rechazo de injerto, autoinmunidad, alergia, asma y enfermedades por infección. El documento WO99/04746 describe procedimientos para detectar o medir la activación de Notch.

- [0004]** Para el hombre, el cáncer de próstata es el segundo cáncer más mortal después del cáncer de pulmón. En estados avanzados, el cáncer de próstata metastatiza al hueso. Dependiendo del estado del cáncer, el tratamiento del cáncer de próstata implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para extirpar el tejido canceroso, radioterapia, quimioterapia, privación de andrógenos (por ejemplo, terapia hormonal) en el caso de cáncer de próstata. La mayoría de los pacientes que se someten a terapia hormonal progresan para desarrollar la enfermedad independiente de andrógenos. Actualmente no hay tratamiento eficaz para el 20 – 40 % de los pacientes con cáncer de próstata que desarrollan enfermedad recurrente después de cirugía o radioterapia, o para aquellos en los que el cáncer ha metastatizado en el momento del diagnóstico. La quimioterapia tiene sus efectos secundarios tóxicos, especialmente en pacientes ancianos. Existe la necesidad de nuevas formas de terapia para cáncer de próstata.

[0005] La presente invención proporciona tratamiento alternativo del cáncer que vence las limitaciones de los procedimientos terapéuticos convencionales, además de ofrecer ventajas adicionales que serán evidentes a partir de la descripción detallada más adelante.

30 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] En una realización, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de disminuir la proliferación de células de cáncer de próstata activando el receptor Notch1.

- [0007]** En otra realización, la invención proporciona procedimientos de diagnosticar cáncer de próstata poniendo en contacto muestras biológicas sospechosas de cáncer de próstata, según las reivindicaciones. El diagnóstico de cáncer de próstata en la muestra biológica incluye poner en contacto la muestra biológica que ha sido obtenida de la próstata de un mamífero con una sonda de receptor Notch1 y determinar el nivel de expresión del receptor Notch1 en la muestra. La invención también proporciona el uso de una forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o un agonista de un preceptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1 para la fabricación de un medicamento para el alivio de cáncer de próstata en un mamífero.

- [0008]** an in vitro En todavía otra realización, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de cribado de compuestos para el tratamiento de cáncer de próstata que comprende poner en contacto el receptor Notch1 con una molécula candidata, determinar la activación de dicho receptor Notch1 e identificar un compuesto que activa dicho receptor Notch1. Preferentemente, el receptor Notch1 es un receptor Notch1 nativo.

- [0009]** Otra realización de la presente invención se refiere a una forma constitutivamente activa del receptor Notch1, o un agonista de un receptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1, para su uso en el alivio de cáncer de próstata en un mamífero.

[0010] En el presente documento también se describe un anticuerpo que se une, preferentemente específicamente, al receptor Notch1. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monocatenario.

- [0011]** En el presente documento también se describen agonistas y antagonistas del receptor Notch como se define en el presente documento. En una realización particular, el agonista es un anticuerpo anti-Notch1, un ligando para Notch1 soluble, o una molécula pequeña.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012]

La Figura 1A muestra un análisis por RT-PCR TAQMAN™ de la expresión de Notch1 en tejido de próstata de rata.

La Figura 1B muestra la hibridación *in situ* de la expresión de Notch1 en próstata de ratón en desarrollo.

- 5 La Figura 2A muestra la expresión de Notch1 en el epitelio que rodea la luz de las unidades epiteliales ductales gemadas de próstata durante el desarrollo (P3) usando un modelo de ratón transgénico Notch1-GFP.

La Figura 2B muestra la expresión de Notch1 en la etapa de desarrollo P12. La mayoría de las células en el epitelio son positivas para la señal de Notch1-GFP.

- 10 La Figura 2C muestra las células en la capa basal del epitelio que muestran expresión de Notch1-GFP más débil en el animal adulto.

La Figura 2D1 muestra la expresión de Notch1-GFP en secciones prostáticas en la etapa de desarrollo P19.

La Figura 2D2 muestra secciones prostáticas tomadas del ratón transgénico Notch1-GFP y marcadas con un marcador de células basales, anti-queratina 14.

- 15 La Figura 2D3 muestra la co-localización de la señal de Notch1 con tinción con anticuerpo para queratina 14, confirmando que Notch1 se expresa en las células basales de la próstata.

La Figura 3 muestra un análisis por RT-PCR TAQMAN™ de Notch1 en células epiteliales de próstata humana primarias y de cáncer prostático.

La Figura 4A-4B muestra la hibridación *in situ* de próstata normal sondada con Notch1 en el modelo de ratón TRAMP.

- 20 La Figura 4C-4D muestra la hibridación *in situ* de células de adenocarcinoma moderadamente diferenciadas sondadas con Notch1 en el modelo de ratón TRAMP.

La Figura 4E-4F muestra la hibridación *in situ* de células tumorales de próstata que habían metastatizado al ganglio linfático sondado con Notch1 en el modelo de ratón TRAMP.

La Figura 4G muestra la tinción para queratina 14 en próstata normal en ratones naturales.

- 25 La Figura 4H muestra la tinción para queratina 14 en un carcinoma bien diferenciado en el modelo de ratón TRAMP.

La Figura 5A muestra un análisis TAQMAN™ de 4 ligandos para Notch conocidos.

La Figura 5B muestra la hibridación *in situ* del ligando para Notch Jagged1 en secciones prostáticas preparadas a partir de ratones TRAMP y ratones naturales.

- 30 La Figura 6A muestra que la expresión de una forma constitutivamente activa de Notch1 disminuye la proliferación celular.

La Figura 6B muestra que el tratamiento de células con una forma constitutivamente activa de Notch1 aumenta la expresión de una construcción de CBP-1/luciferasa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS

- 35 **[0013]** La invención engloba varios aspectos. Un aspecto de la invención es un procedimiento *in vitro* para inhibir o disminuir la proliferación de células de cáncer de próstata administrando agonista de un receptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1 que produce activación de la señalización de Notch. Otro aspecto de la invención es el uso de una forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o un agonista de un receptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1 para la fabricación de un medicamento para el alivio de cáncer de próstata en un mamífero.

- 40 **[0014]** Para aplicaciones terapéuticas, los activadores de la señalización de Notch pueden usarse solos, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiógenos o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia.

- 45 **[0015]** Un componente de unión del receptor Notch1 útil en la destrucción de células cancerosas, en particular células de cáncer de próstata, incluye anticuerpos anti-Notch1 y fragmentos de los mismos. Los componentes de unión pueden conjugarse con un agente citotóxico. Los anticuerpos son preferentemente anticuerpos internalizantes y/o inhibidores del crecimiento. El agente citotóxico puede ser una toxina, antibiótico, isótopo radiactivo o enzima nucleolítica. Un agente citotóxico preferido es una toxina, preferentemente una toxina de molécula pequeña tal como

caliqueamicina o un maitansinoide.

[0016] Los agonistas y componentes de unión del receptor Notch pueden producirse sintéticamente o recombinantemente o aislarse de otro modo.

[0017] En el presente documento también se describen agonistas del receptor Notch1 que inhiben o disminuyen el crecimiento o proliferación de células cancerosas. También se describen composiciones que comprenden uno o más agonistas del receptor Notch1 eficaces para su uso en los procedimientos anteriormente mencionados, y un vehículo. Un agonista del receptor Notch incluye un anticuerpo anti-receptor Notch1 y fragmentos del mismo

[0018] El anticuerpo en la composición puede ser un anticuerpo humanizado. El vehículo puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden proporcionarse en un artículo de fabricación o un kit.

[0019] En el presente documento también se describe un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo internalizante o anti-receptor Notch citotóxico de la invención, además de un vector que comprende el ácido nucleico. La secuencia de ADN de Notch1 humano puede encontrarse usando el número de acceso de GenBank HUMTAN 1. En el presente documento también se describen células que incluyen *E. coli* e hibridomas que producen los anticuerpos anteriormente descritos.

[0020] "Notch" engloba todos los miembros de la familia de receptores Notch y en particular Notch1. Un "agonista" del receptor Notch, además de unirse al receptor Notch, tiene un efecto directo sobre una célula que lleva el receptor Notch. El agonista del receptor Notch se unirá al receptor Notch, y también, iniciará o mediará en el acontecimiento de señalización asociado al receptor Notch tal como, por ejemplo, para hacer que el dominio intracelular de Notch se escinda y transloque al núcleo. Aquí induce la síntesis de represores transcripcionales conocidos como HES-1. Cuando se prueban formas truncadas de ECD de Notch, el promotor HES-1 se estimula fuertemente. La activación del promotor HES-1 puede ensayarse *in vitro*. La capacidad para inducir la activación del receptor Notch puede cuantificarse usando técnicas conocidas en la materia tales como construcciones indicadoras tales como beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT) o luciferasa.

[0021] La proliferación de células cancerosas se reduce o detiene cuando el receptor Notch se activa por contacto con un agonista o activador de receptor Notch añadido o administrado, en comparación con la situación en ausencia de agonista. Los ensayos de proliferación se describen más adelante.

[0022] Los ligandos Notch incluyen Jagged1, Jagged2, Delta y Delta4.

[0023] El cáncer de próstata incluye específicamente adenocarcinoma de próstata y metástasis relacionadas.

[0024] El término "variante de la secuencia de aminoácidos" se refiere a un polipéptido que tiene secuencias de aminoácidos que se diferencian en cierto grado de un polipéptido de secuencia nativa. Generalmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos del receptor Notch poseerán al menos aproximadamente el 70 % de homología con el receptor Notch de secuencia nativa, preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 85 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de homología, y lo más preferentemente al menos el 95 %. Las variantes de la secuencia de aminoácidos pueden poseer sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

[0025] "Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente documento, significa polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna por el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no estará presente al menos un componente del entorno natural del polipéptido Notch. Generalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación

[0026] El término "anticuerpo" (Ab) como se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, mientras que presentan la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento. Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo como se ha determinado por el procedimiento de Lowry y, lo

más preferentemente, a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna por el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0027] El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores.

[0028] Un anticuerpo que “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítope sobre un polipéptido particular es uno que se une a ese polipéptido o epítope particular sobre un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítope de polipéptido.

[0029] Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (véanse la patente de EE.UU. n° 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 – 6855 (1984)). Anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio superior, etc.) y secuencias de la región constante humana.

[0030] Un “fragmento de anticuerpo” comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057 – 1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0031] “Fv monocatenario” también abreviado “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido de sFv comprende además un ligador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269 – 315 (1994); Borrebaeck 1995, más adelante.

[0032] El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos de sFv (véase el párrafo precedente) con ligadores cortos (aproximadamente 5 – 10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de forma que se logre el apareamiento entre cadenas, pero no dentro de las cadenas, de los dominios V, produciendo un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “cruzados” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes sobre cadenas de polipéptidos diferentes. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 – 6448 (1993).

[0033] Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región hipervariable del receptor están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseada. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un, y normalmente dos, dominios variables, correspondiéndose todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones y col., Nature 321: 522 – 525 (1986); Riechmann y col., Nature 332: 323 – 329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 – 596 (1992).

[0034] La palabra “marca” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición

detectable que está directamente o indirectamente conjugado con el anticuerpo de forma que se genere un anticuerpo “marcado”. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que sea detectable.

- 5 **[0035]** Por “fase sólida” se indica una matriz no acuosa con la que el anticuerpo de la presente invención puede adherirse. Ejemplos de fases sólidas englobadas en el presente documento incluyen aquellas formadas parcialmente o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. nº 4.275.149.

- 15 **[0036]** El término “marcado con epítipo” cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido fusionado con un “polipéptido de marca”. El polipéptido de marca tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de forma que no interfiere con la actividad del polipéptido con el que está fusionado. El polipéptido de marca también es preferentemente casi único, de manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Polipéptidos de marca adecuados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferentemente entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

- 20 **[0037]** Como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y de unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”), y una secuencia constante del dominio de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

- 30 **[0038]** Un anticuerpo anti-receptor Notch que “internaliza” es uno que es recogido por (es decir, entra en) la célula tras la unión a Notch de la superficie celular sobre una célula de mamífero. El anticuerpo internalizante incluirá por supuesto fragmentos de anticuerpos, anticuerpo humano o humanizado y anticuerpo conjugado. Para aplicaciones terapéuticas se contempla la internalización *in vivo*. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas será suficiente o adecuado para destruir una célula cancerosa que expresa Notch. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la captación de una única molécula de anticuerpo en la célula es suficiente para destruir la célula diana a que el anticuerpo se une. Por ejemplo, ciertas toxinas son altamente potentes en la destrucción, de forma que la internalización de una molécula de la toxina conjugada con el anticuerpo es suficiente para destruir la célula tumoral. Si un anticuerpo se internaliza tras la unión a Notch sobre una célula de mamífero puede determinarse por diversos ensayos, por ejemplo, por microscopía confocal o electrónica usando anticuerpo fluorescente o radiomarcado.

- 40 **[0039]** Un “anticuerpo que inhibe el crecimiento de células cancerosas que expresa receptor Notch o un anticuerpo “inhibidor del crecimiento” es uno que se une a y produce inhibición medible del crecimiento de células cancerosas que expresan o que expresan en exceso receptor Notch. Anticuerpos inhibidores del crecimiento y anti-receptor Notch preferidos inhiben el crecimiento del receptor Notch que expresa células tumorales (por ejemplo, células de cáncer de próstata) más del 20 %, preferentemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %, e incluso más preferentemente más del 50 % (por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) con respecto al control apropiado, siendo el control normalmente células tumorales no tratadas con el anticuerpo que se prueba. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si, por ejemplo, la administración del anticuerpo anti-receptor Notch a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce la reducción en tamaño del tumor o proliferación de células tumorales en el plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en el plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

- 55 **[0040]** Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular regulado por incremento. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer

de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma penil, además de cáncer de cabeza y cuello.

[0041] Un “cáncer que expresa receptor Notch” es un cáncer que comprende células que tienen proteína de receptor Notch presente sobre la superficie celular. Un “cáncer que expresa receptor Notch” produce niveles suficientes de receptor Notch sobre la superficie de células del mismo, de forma que un agonista de receptor Notch o anticuerpo puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Un cáncer que “expresa en exceso” receptor Notch es uno que tiene niveles significativamente mayores de receptor Notch en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. La expresión en exceso del receptor Notch puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando niveles elevados de la proteína del receptor Notch presentes sobre la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo inmunohistoquímico; análisis de FACS). Alternativamente, o adicionalmente, pueden medirse niveles de ácido nucleico o ARNm que codifica receptor Notch en la célula, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente *in situ*; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern, transferencia Northern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También puede estudiarse la expresión en exceso del receptor Notch midiendo el antígeno eliminado en un líquido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpo (véanse, por tanto, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col. J. Immunol Methods 132: 73 – 80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el médico experto. Por ejemplo, pueden exponerse células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, por barrido externo para radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0042] “Alivio del cáncer” se refiere a tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medida preventiva en la que el objeto es evitar o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico elegido como diana. Aquellos en necesidad de alivio incluyen aquellos ya con el trastorno, además de aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. Un sujeto o mamífero es “aliviado” de un cáncer que expresa receptor Notch si, después de recibir una cantidad terapéutica de un agonista del receptor Notch, el paciente muestra reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de las células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización a cierto grado y preferentemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibición (es decir, ralentización a cierto grado y preferentemente detención) de metástasis tumorales; inhibición, a cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio a cierto grado de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico, y morbilidad y mortalidad reducida. Hasta el punto de que el agonista del receptor Notch o anticuerpo puedan prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentida por el paciente.

[0043] Administración “crónica” se refiere a administración del (de los) agente(s) en un modo continuo a diferencia de un modo agudo, de forma que se mantenga el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. Administración “intermitente” es tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

[0044] Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para terapia del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). Para cáncer de próstata, el progreso de la terapia puede evaluarse por procedimientos rutinarios, normalmente midiendo niveles de PSA (antígeno prostático específico) en suero; cuanto mayor sea el nivel de PSA en sangre, más extenso será el cáncer. Están disponibles ensayos comerciales para detectar PSA, por ejemplo, kit de ensayo Hybritech Tandem-E y Tandem-R PSA, el ensayo policlonal Yang ProCheck (Yang Labs, Bellevue, WA), Abbott Imx (Abbott Labs, Abbott Park, IL), etc. Las metástasis pueden determinarse por pruebas de estadificación y por barridos óseos y pruebas para el nivel de calcio y otras enzimas para determinar la diseminación al hueso. También pueden hacerse barridos de CT para buscar la diseminación a la pelvis y ganglios linfáticos en el área. La radiografía del tórax y la medición de los niveles de enzimas en el hígado mediante procedimientos conocidos se usan para buscar metástasis a los pulmones e hígado, respectivamente. Otros procedimientos rutinarios para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal con aguja (TRNB).

[0045] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agonista, anticuerpo o un fármaco eficaz para “aliviar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente detener) metástasis tumorales; inhibir, a cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar a cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase

la definición precedente de “aliviar”. Hasta el grado de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

[0046] Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

- 5 **[0047]** “Vehículos” como se usa en el presente documento incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución tamponada acuosa a pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero; gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

[0048] “Mamífero” para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deporte o mascotas tales como perros, gatos, reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es el ser humano.

- 20 **[0049]** El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce destrucción de células. Está previsto que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos desvelados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante.

- [0050]** Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa receptor Notch, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan receptor Notch en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

[0051] Una “molécula pequeña” se define en el presente documento por tener un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Daltons.

- [0052]** Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN, o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma, además de proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan naturalmente a una secuencia nativa. El término engloba una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido sacada de su entorno en el que se produce naturalmente, e incluye cepas aisladas de ADN recombinantes o clonadas y análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula.

- [0053]** “Vector” incluye vectores lanzadera y de expresión. Normalmente, la construcción de plásmido también incluirá un origen de replicación (por ejemplo, el origen ColE1 de replicación) y un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina) para la replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en bacterias. Un “vector de expresión” se refiere a un vector que contiene los elementos reguladores necesarios para la expresión de los anticuerpos que incluyen fragmento de anticuerpo de la invención, en células bacterianas o eucariotas.

- 55 **[0054]** Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido de Notch o anticuerpo para el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma está comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

[0055] Los agonistas del receptor Notch y anticuerpos inhibidores del crecimiento celular de cáncer de próstata desvelados en el presente documento también tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. En vista del hecho de que el uso de PSA como herramienta para cribar o diagnosticar cáncer de próstata es controvertido, los agonistas y anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles para diagnosticar y estadificar cánceres que expresan Notch (por ejemplo, en obtención de imágenes por rayos X). Los anticuerpos también son útiles para la purificación o inmunoprecipitación de Notch de células, para la detección y cuantificación de Notch *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para destruir y eliminar células que expresan Notch de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células.

[0056] Los agonistas del receptor Notch y anticuerpos pueden fusionarse con una secuencia de polipéptidos heteróloga. El anticuerpo puede modificarse en la región Fc para proporcionar funciones efectoras deseadas. Como se trata en más detalle en las siguientes secciones, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido sobre la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o reclutando complemento en citotoxicidad dependiente del complemento, o algún otro mecanismo.

[0057] Los presentes agonistas del receptor Notch y anticuerpos son útiles para tratar un receptor Notch que expresa cáncer o alivia uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Un cáncer tal es cáncer de próstata. El anticuerpo puede unirse a al menos una parte de las células cancerosas que expresan receptor Notch en el mamífero y preferentemente es uno que no induce o que minimiza respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano). En una realización preferida, el anticuerpo es eficaz para destruir o matar células tumorales que expresan receptor Notch o inhibir el crecimiento de tales células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al receptor Notch sobre la célula. Un anticuerpo tal incluye un anticuerpo anti-receptor Notch desnudo (no conjugado con ningún agente). Anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular pueden aprovecharse adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas pueden conferirse a un anticuerpo anti-Notch, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico para formar un inmunoconjugado como se describe más adelante. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Se prefieren toxinas tales como caliqueamicina o un maitansinoide, y análogos o derivados de los mismos

II. Producción de anticuerpos anti-Notch1

(i) Anticuerpos policlonales

[0058] Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoi-sulfosuccinimida (conjugación por residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (por residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

[0059] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Por tanto, agentes agregantes tales como alumbre se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmunitaria.

(ii) Anticuerpos monoclonales

[0060] Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o resto no proteináceo mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. nº 4.816.567).

[0061] En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y luego se fusionan con una línea de células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59 – 103 (Academic Press, 1986)).

[0062] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, medio que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las

células de mieloma sin fusionar parentales (también denominado componente de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

- 5 **[0063]** Células de mieloma de componentes de fusión preferidos son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales sin fusionar. Líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 y
- 10 derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51 – 63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).
- 15 **[0064]** El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están cultivándose se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).
- [0065]** La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de
- 20 Scatchard descrito en Munson y col., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).
- [0066]** Una vez se han identificado las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59 – 103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-
- 25 1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección i.p. de las células en ratones.
- [0067]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de
- 30 intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.
- [0068]** El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión
- 35 que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de anticuerpo para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 – 262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 – 188 (1992).
- 40 **[0069]** En otra realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348: 552 – 554 (1990). Clackson y col., Nature, 352: 624 – 628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 – 597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por
- 45 barajado de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10: 779 – 783 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res. 21: 2265 – 2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- [0070]** El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo las secuencias del
- 50 dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera humana (C_H y C_L) por las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. n° 4.816.567; y Morrison, y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. Las secuencias de polipéptido de no inmunoglobulina pueden sustituirse con los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidas con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno
- 55 de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

[0071] Se han descrito procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos no humanos de aminoácidos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos “importados”, que se toman normalmente de un dominio variable “importado”. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522 – 525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332: 323 – 327 (1968); Verhoeven y col., *Science*, 239: 1534 – 1536 (1998)) sustituyendo secuencias de regiones hipervariables con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0072] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad y respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo está previsto para uso terapéutico humano. Según el llamado procedimiento “de mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia del dominio V humana que está más próxima a la del roedor es identificada y la región estructural humana (FR) en su interior es aceptada para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) *J. Immunol.*, 151: 2296; Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901 (1997)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0073] Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

[0074] Se contemplan diversas formas de un anticuerpo anti-Notch humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

(iv) Anticuerpos humanos

[0075] Como una alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255 – 258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immuno*, 7: 33 (1993); las patentes de EE.UU. nº 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852.

[0076] Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., *Nature* 348, 552 – 553 [1990]) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en una variedad de formas, revisadas en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564 – 571 (1993). Pueden

usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., *Nature* 352, 624 – 628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222, 581 – 597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12, 725 – 734 (1993). Véase, por tanto, las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

[0077] Como se trata anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

10 (v) Fragmentos de anticuerpos

[0078] En ciertas circunstancias hay ventajas de uso de fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite la rápida eliminación, y puede conducir al acceso mejorado a tumores sólidos.

[0079] Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107 – 117 (1992); y Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163 – 167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con elevada semivida *in vivo* que comprende residuos del epítipo de unión al receptor silvestre se describe en la patente de EE.UU. nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. nº 5.571.894; y patente de EE.UU. nº 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuadas para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de sFv para dar la fusión de una proteína efectora en tanto el extremo amino como el carboxi de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.641.870. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

[0080] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína del receptor Notch. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión del receptor Notch con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-receptor Notch puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera que centren y localicen mecanismos de defensa celular para la célula que expresa receptor Notch. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan receptor Notch. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a receptor Notch y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-γ, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0081] El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRIII biespecífico y la patente de EE.UU. nº 5.837.234 desvela un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRI biespecífico. Un anticuerpo anti-ErbB2/Fcγ biespecífico se muestra en el documento WO98/02463. La patente de EE.UU. nº 5.821.337 enseña un anticuerpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico.

[0082] Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1993)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10: 3655 – 3659 (1991).

[0083] Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de Ig que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no tengan efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada. Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. n° 5.731.168, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidos con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

[0084] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

[0085] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan y col., Science, 229: 81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0086] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med., 175: 217 – 225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

[0087] También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol., 148(5): 1547 – 1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 – 6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber y col., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

[0088] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos

triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147: 60 (1991).

- [0089]** Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo puede incorporarse un epítipo de unión al receptor silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.739.277. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

(viii) *Cribado de anticuerpos con las propiedades deseadas*

- [0090]** Anteriormente se han descrito técnicas para generar anticuerpos. Pueden seleccionarse adicionalmente anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee. Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-receptor Notch de la invención pueden evaluarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan un receptor Notch tanto endógenamente como tras la transfección con el gen del receptor Notch. Por ejemplo, las líneas celulares tumorales y células transfectadas con el receptor Notch pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal anti-receptor Notch de la invención a diversas concentraciones durante algunos días (por ejemplo, 2 – 7) y teñirse con violeta cristal o MTT o analizarse por algún otro ensayo colorimétrico. Otro procedimiento de medición de la proliferación sería comparar la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-receptor Notch de la invención. Después del tratamiento del anticuerpo, las células se recogen y la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de centelleo. Controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. Preferentemente, el agonista del receptor Notch inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa receptor Notch *in vitro* o *in vivo* aproximadamente el 25 – 100 % en comparación con la célula tumoral sin tratar, más preferentemente aproximadamente el 30 – 100 %, e incluso más preferentemente aproximadamente el 50 – 100 % o el 70 – 100 %, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1 – 10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-receptor Notch a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce la reducción en el tamaño del tumor o proliferación de células tumorales en el plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en el plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

Maitansina y maitansinoides

- [0091]** En una realización preferida, un anticuerpo anti-receptor Notch (longitud completa o fragmentos) de la invención está conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

- [0092]** Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. nº 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533. La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

- [0093]** Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-receptor Notch radioconjugados. Ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I¹²³, o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

- [0094]** Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49 – 57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

- [0095]** Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes

de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de EE.UU. n° 5.208.020).

[0096] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-receptor Notch y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0097] En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

(x) Terapia con profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT)

[0098] Los anticuerpos de la presente invención también puede usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07370 y la patente de EE.UU. n° 4.975.278.

[0099] El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

[0100] Enzimas que son útiles en la presente realización incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir no 5-fluorocitosina tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres y penicilina amidasas tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa útiles para convertir fármacos derivatizados con grupos nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457 – 458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describen en el presente documento para administrar la abzima a una población de células tumorales.

[0101] Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos anti-receptor Notch por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales anteriormente tratados. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención pueden construirse usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604 – 608 (1984)).

(xi) Otras modificaciones de anticuerpos

[0102] En el presente documento se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en

Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980).

(ix) Purificación de anticuerpo anti-receptor Notch

- [0103]** Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163 – 167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta de células en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos de células pueden eliminarse por centrifugación. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes fortuitos.
- [0104]** La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., *J. Immunol. Methods* 62: 1 – 13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.
- [0105]** Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 – 4,5, realizado preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0 – 0,25 M).

III. Formulaciones farmacéuticas

- [0106]** Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados según la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivo tal como polisorbato; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferentemente el anticuerpo a una concentración de entre 5 – 200 mg/ml, preferentemente entre 10 – 100 mg/ml.
- [0107]** La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-receptor Notch que internaliza, puede desearse incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-receptor Notch que se une a un epítopo diferente sobre el receptor Notch; o un anticuerpo para alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento del cáncer particular. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

[0108] Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0109] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0110] Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0111] Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo anti-receptor Notch1 conjugado con un agente citotóxico puede administrarse al paciente. Preferentemente, el inmunoconjugado unido a la proteína del receptor Notch1 es internalizado por la célula, produciendo un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa con la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico elige como diana o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de tales agentes citotóxicos se describen anteriormente e incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

[0112] Los anticuerpos anti-receptor Notch1 o inmunoconjugados se administran a un paciente humano según procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

[0113] Otras pautas terapéuticas pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-receptor Notch1. La administración combinada incluye co-administración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente, tal terapia combinada produce un efecto terapéutico sinérgico.

[0114] También puede desearse combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-receptor Notch1 con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno de tumor asociado al cáncer particular.

35 IV. Administración de anticuerpos anti-receptor Notch1

[0115] El tratamiento terapéutico con anticuerpos implica la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-receptor Notch1 y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen la co-administración de mezclas de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos incluyen antibióticos de fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxiaurea e hidroxiaureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antraciclina. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico experto. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0116] El anticuerpo puede combinarse con un compuesto antihormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno; una antiprogesterona tal como onapristona (véase el documento EP 616 812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para tales moléculas. Si el cáncer que va a tratarse es cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede haberse sometido previamente a terapia antiandrogénica y, después de que el cáncer se convierta en independiente de andrógenos, el anticuerpo anti-receptor Notch1 (y opcionalmente otros agentes como se describen en el presente documento) puede administrarse al paciente.

[0117] Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación y el modo de administración se elegirán por el médico según criterios conocidos. La dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo se administra por infusión

intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1 – 15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como si es por infusión continua. Una pauta de dosificación

5 puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-receptor Notch. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante

10 varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. El progreso de esta terapia puede monitorizarse fácilmente mediante procedimientos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos para el médico u otros expertos en la materia.

V. Artículos de fabricación y kits

[0118] En el presente documento también se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el alivio de cáncer que expresa anti-receptor Notch, en particular cáncer de próstata. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para aliviar la afección por cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o

20 un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-receptor Notch1. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar cáncer de próstata, cáncer de próstata independiente de andrógenos o cáncer de próstata dependiente de andrógenos, o cáncer de vejiga. La etiqueta o prospecto comprenderá además instrucciones para administrar la composición de agonista o anticuerpo al paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede

25 comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

[0119] En el presente documento también se describen kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células que expresan receptor Notch, para la purificación o inmunoprecipitación de receptor Notch de células. Para el aislamiento y la purificación de receptor Notch, el kit puede contener un anticuerpo anti-receptor Notch acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de Sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de receptor Notch *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta

35 o prospecto sobre o asociado al recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-receptor Notch. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La marca o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, además de instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico previsto.

VI. Ejemplos

40 Ejemplo 1: Expresión de Notch1 durante el desarrollo prostático

[0120] Para determinar si Notch1 se expresa en la próstata y si desempeña una función en la próstata en desarrollo se realizó RT-PCR cuantitativa TAQMAN™ usando ARN extraído de los órganos de próstata de preparación completa preparados a partir de ratas en diferentes etapas de desarrollo. El tejido prostático se diseccionó de ratas en las etapas de desarrollo día 1 posnatal (P1), día 10 posnatal (P10) y adulto, se dispuso en

45 tampón de lisis y se homogenizó mediante una columna Qiashredder (Qiagen, Valencia CA). El ARN total se aisló inmediatamente usando el protocolo de RNeasy (Qiagen, Valencia CA). El gen de mantenimiento de rata, gapdh, se usó como control y los resultados experimentales de interés se normalizaron a niveles de expresión de gapdh. Las secuencias de cebador de gapdh de rata se informan en Zheng y col., (1999) Journal of Neurocytology. 28: 901-912. Las amplificaciones por RT-PCR iniciales se confirmaron por electroforesis en gel de agarosa para garantizar que los

50 productos de reacción tuvieran los pesos moleculares correctos. Los cebadores/sondas para Notch1 de rata son del siguiente modo:

Conjunto de cebadores de Notch1 de rata

Cebador directo	5' GGAGAGGCTGCCAAGGTTTT 3' SEQ ID NO. 1
Cebador inverso	5' GCAAATTGGCCGTCAGGA 3' SEQ ID NO. 2
Sonda	5' CGGCTTCCAAGTGGTGCCGG 3' SEQ ID NO. 3

Resultados

[0121] Notch1 se expresa a altos niveles en la próstata en desarrollo en el día 1 postnatal al día 10 posnatal (P1 a P10). La expresión de Notch1 se reguló por disminución en el adulto. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 1A.

5 **Ejemplo 2: La expresión de Notch1 está asociada a las células epiteliales basales**

[0122] Se generaron ribosondas sentido y antisentido marcadas a partir de productos de PCR clonados en vectores de transcripción. El ADNc de Notch1 murino se clonó en pBluescript (Stratagene, La Jolla CA) y la sonda se extendió de los nucleótidos 3773 a 4639 (866 pb) de la secuencia de Notch1 de ratón. Para la secuencia de Notch1 murina véase el acceso de GenBank Z11886. Los cebadores incluyeron extensiones que codificaban sitios de iniciación de T7 o T3 ARN polimerasa de 27 nucleótidos para permitir la transcripción *in vitro* de sondas sentido o antisentido, respectivamente, de los productos amplificados (Lu y col. Cell Vision 1994, 1: 169-176). Se desparafinaron secciones de cinco µm de espesor, se desproteíaron en 4 µg/ml de proteinasa K durante 30 minutos a 37 °C, y adicionalmente se procesaron para la hibridación *in situ*. Las sondas sentido y antisentido marcadas con ³³P-UTP se hibridaron con las secciones a 55 °C durante la noche. La sonda sin unir se eliminó por incubación en 20 mg/ml de RNasa A durante 30 minutos a 37 °C, seguido de un lavado a alta rigurosidad a 55 °C en 0,1 X SSC durante 2 horas y deshidratación mediante concentraciones escalonadas de etanol. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de trazas nucleares NBT2 (Eastman Kodak), se expusieron en cajas de portaobjetos de plástico cerradas que contenían desecante durante 4 semanas a 4 °C, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina. La hibridación *in situ* se realizó rutinariamente en secciones por duplicado con sondas sentido y antisentido.

20 Resultados

[0123] La hibridación *in situ* se usó para determinar si Notch1 era o no expresado por células epiteliales o células del estroma en la próstata. La señal de Notch1 se observó específicamente en células epiteliales, pero no en células del estroma en tanto el día 3 posnatal (P3) como el día 16 posnatal (P16). Esto se muestra gráficamente en la Figura 1B.

25 **Ejemplo 3: Expresión de Notch1 en células epiteliales basales**

[0124] En el Ejemplo 2, experimentos de hibridación *in situ* radiactiva mostraron patrones de expresión de Notch1 limitados en epitelio de próstata, pero no proporcionan la solución para distinguir qué tipo de células epiteliales expresaron específicamente Notch1. Para determinar con precisión el patrón de expresión de Notch1 en el epitelio de próstata, secciones de tejido de próstata se tomaron de ratones transgénicos que expresaron el gen de marcador para la proteína de fluorescencia verde (GFP) bajo el control del promotor de Notch1. En estos ratones transgénicos, las células que expresan Notch1 fluorescen de verde. Se realizó una comparación de ratones Notch1-GFP con hibridación *in situ* para Notch1 y se informó en la bibliografía (Lewis y col., Mechanisms of Development (1998)78: 159 – 163).

Resultados

[0125] En el día 3 posnatal (P3) hubo una señal de GFP robusta en el epitelio que rodeaba la luz del epitelio ductal gemado. En esta etapa de desarrollo, todas las células en el epitelio se marcaron, y mostraron una morfología con forma de tonel típica que se extendía de la base a la luz (Figura 2A). En el día 12 posnatal (P12), la mayoría de las células en el epitelio todavía fueron positivas para GFP, algunas habían perdido la señal de GFP (Figura 2B). En el adulto, el marcado con GFP fue mucho más débil, y sólo una pequeña fracción de células en la capa basal profunda del epitelio fueron positivas para GFP. Las células positivas para GFP en la próstata adulta mostraron un cuerpo de célula redondo pequeño con procesos delgados en lugar de una forma columnar o similar a tonel (Figura 2C).

[0126] Para confirmar la identidad de la célula basal de las células positivas para GFP en la próstata, las secciones prostáticas se marcaron adicionalmente con un marcador de células basales, anticuerpo anti-citoqueratina 14 (Hayward y col., (1996) Acta Anatomica 155: 81 – 93). Aproximadamente todas las células positivas para GFP también se marcaron por el anticuerpo anti-citoqueratina 14, confirmando así el tipo de célula basal (Figura 2D2). Los resultados de P19 Notch1-GFP y Notch1-GFP/citoqueratina 14 se muestran en las Figuras 2D1 – 2D3.

Ejemplo 4: Notch1 se expresa en células de cáncer de próstata

[0127] El patrón de Notch1 en células de cáncer de próstata se determinó realizando análisis TAQMAN™ en ARN extraído de las líneas de células de cáncer de próstata DU145, LNCaP, PC3 y la línea de células epiteliales prostáticas PrE (Clonetics, Walkersville MD). Se aisló ARN total de estas líneas celulares usando el protocolo RNeasy (Qiagen, Valencia CA). La síntesis de la primera cadena se realizó usando transcriptasa inversa M-MLV (Gibco BRL, Gaithersburg MD). Esta síntesis de la primera cadena se analizó por análisis por PCR TAQMAN, de nuevo usando gapdh como control para los niveles de expresión. La secuencia de ADN de Notch1 humana puede encontrarse usando el número de acceso de GenBank

HUMTAN1. Los cebadores usados para Notch1 son del siguiente modo:

Conjunto de cebadores para Notch humano

[0128]

Cebador directo	5' CAGTGTGGGCGGGTCC 3' SEQ ID NO. 4
Cebador inverso	5' GTIGTA1TGGTICGGCACCA 3' SEQ ID NO. 5
Sonda	5' CCGCTCTGCAGCCGGGACA 3' SEQ ID NO. 6

5 Conjunto de cebadores para gapdh humano

[0129]

Cebador directo	5' CTCCTCCACCITTGACGCTG 3' SEQ ID NO. 7
Cebador inverso	5' CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA 3' SEQ ID NO. 8
Sonda	5' CTGGCATTGCCCTCAACGACCAC 3' SEQ ID NO. 9

Resultados

[0130] Se encontró que Notch1 se expresaba altamente en células LNCaP, pero muy poco en células DU145.

- 10 Las células PC3 mostraron expresión moderada. Los niveles de la expresión de Notch1 fueron los mayores en células PrE. Este resultado se muestra gráficamente en la Figura 3.

Ejemplo 5: La expresión de Notch1 es elevada en células tumorales prostáticas malignas y metastásicas en un modelo de ratón TRAMP

[0131] Un modelo animal bien establecido para cáncer de próstata humano es el Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate™ (TRAMP™) (Greenberg NM, 1995, PNAS 92: 3439 – 43). Aunque hay diferencias anatómicas significativas en la próstata de ratón en comparación con la del ser humano, hay características comunes inherentes que incluyen función secretora y regulación hormonal. En el modelo TRAMP™, el promotor mínimo del gen probasina de rata elige como diana la expresión del antígeno T grande de SV40 para el epitelio prostático. Todos los ratones TRAMP macho progresan al cáncer de próstata normalmente en 8 – 12 semanas (Gingrich JR y col., 1997, Cancer Research 57: 4687 – 91). El modelo TRAMP™ autóctono es particularmente relevante para carcinoma de próstata humano en el que el desarrollo del cáncer es específico para el epitelio prostático y está inicialmente regulado por andrógenos. Además, eventualmente se producen metástasis a sitios distantes (Gingrich JR y col., 1996, Cancer Research 56: 4096 – 102; Gingrich JR y col., 1999, Prostate Cancer & Prostatic Diseases 2: 70 – 75).

- 25 [0132] Ratones CD-1 adultos macho y hembra entre las edades de 10 y 24 semanas se obtuvieron de Charles River Laboratories. Se ordenaron ratones preñados para la recogida de embriones. El día de aislamiento con tapón copulatorio se consideró el día 1 del desarrollo embrionario. Los tejidos fetales examinados por ISH incluyeron: E10, E13, E14, E15, E17 y E18. Los tejidos adultos examinados incluyeron: tejidos del aparato genitourinario masculino, vejiga urinaria y riñón femeninos, glándula mamaria puberal, glándula mamaria preñada de 14 días, glándula mamaria lactante, hígado, corazón, piel e intestino. Todos los tejidos se fijaron en 4 % de formalina y se incorporaron en parafina. Los pares de criadores de ratones transgénicos TRAMP™ se obtuvieron del Dr. Norman Greenberg (Baylor College of Medicine, Houston, TX). Los tejidos genitourinarios del compañero de camada natural C57BL/6 se tomaron a la edad de 12 y 24 para la comparación con ratones transgénicos TRAMP™ de la misma edad. A la edad de 12 semanas, los ratones TRAMP™ han progresado normalmente a PIN y o tumores bien diferenciados. Los ratones macho TRAMP™ entre las edades de 12 y 39 semanas de edad se sacrificaron y los tejidos se recogieron para histología rutinaria y estudios de ISH. El grado histológico del cáncer de próstata se determinó según estudios previamente publicados en el modelo TRAMP™ (Gingrich JR. y col., 1999, Prostate Cancer & Prostatic Diseases 2: 70 – 75).

Resultados

- 40 [0133] Este conjunto de experimentos se realizó para determinar si hubo algún cambio en los niveles de la expresión de Notch1 en la próstata de ratón TRAMP, específicamente, en células malignas durante la tumorigénesis prostática. La hibridación *in situ* de los tejidos de ratones TRAMP demostró que la próstata normal expresó niveles indetectables de Notch1 (Figura 4A, 4B). A diferencia, células de adenocarcinoma moderadamente diferenciadas (Figura 4C, 4D), células de adenocarcinoma escasamente diferenciadas y algunas áreas de neoplasia intraepitelial

prostática (PIN) expresaron altos niveles de Notch1. La células tumorales de próstata que habían metastatizado al ganglio linfático también expresaron niveles sustancialmente mayores de Notch1 cuando se compararon con el tejido normal vecino (Figura 4E, 4F).

[0134] Debido a que la expresión de Notch1 está asociada a la población de células basales durante el desarrollo prostático, el hallazgo de que la expresión de Notch esté regulada por incremento en las células malignas en la próstata de TRAMP plantea una cuestión de si estas células malignas poseen futuros de células basales. Se hizo inmunohistoquímica usando anticuerpo anti-citoqueratina 14, un marcador de células basales, en tejido prostático preparado a partir de ratones TRAMP y naturales. Se encontró que la gran mayoría de las células fueron negativas para citoqueratina 14 en PIN (datos no mostrados) y carcinomas de TRAMP de bien a moderadamente diferenciados (Fig. 4H), aún cuando se observó un pequeño número de células positivas para citoqueratina 14. No hubo aumento aparente en el número de células positivas para citoqueratina 14 en PIN y adenocarcinomas de los ratones TRAMP con respecto a la próstata normal en ratones naturales (Fig. 4G). En realidad, en carcinomas de moderadamente a escasamente diferenciados de TRAMP, prácticamente todas las células fueron negativas para citoqueratina 14 (datos no mostrados). Estos resultados muestran que en las células malignas de TRAMP, la expresión de Notch1 está desacoplada de la expresión de citoqueratina 14.

Ejemplo 6: Niveles de expresión de ligandos de Notch1 en células de cáncer de próstata

[0135] Como los ligandos para Notch1 activan el receptor, es necesario entender si los ligandos para Notch1 también se expresan en células cancerosas prostáticas. Por tanto, se realizó análisis TAQMAN™ para cuatro ligandos para Notch1, Jagged1, Jagged2, Delta y Delta4. El ARN para este experimento se aisló como se describe en el Ejemplo 4.

Conjunto de cebadores para Jagged1

[0136]

Cebador directo	5' CAACCGCATCGTGCTGC 3' SEQ ID NO. 10
Cebador inverso	5' CGCCTCCACAAGCAACGTA 3' SEQ ID NO. 11
Sonda	5' CCTCGGCCAGGCGAAACTGAAA 3' SEQ ID NO. 12

Conjunto de cebadores para Jagged2

[0137]

Cebador directo	5' CGCTGTATGAAAGGAGAGAGCAA 3' SEQ ID NO. 13
Cebador inverso	5' CCGAGTGAGGAATAAAAGGAAGATT 3' SEQ ID NO. 14
Sonda	5' TGCACAACCTCTGGTAACAAACGCGA 3' SEQ ID NO. 15

Conjunto de cebadores para Delta

[0138]

Cebador directo	5' TGTGTGACGAACACTACTACGGAG 3' SEQ ID NO. 16
Cebador inverso	5' GTGAAGTGGCCGAAGGCA 3' SEQ ID NO. 17
Sonda	5' TTCTGCCGTCCCCGGGACG 3' SEQ ID NO. 18

Conjunto de cebadores para Delta4

[0139]

35

Cebador directo	5' CTGGAGCTCAGCGAGTGTGAC 3' SEQ ID NO. 19
Cebador inverso	5' GCCATCCTCCTGGTCCTTAC 3' SEQ ID NO. 20
Sonda	5' ACCCCTGTCGCAATGGAGGCAG 3' SEQ ID NO. 21

Resultados

[0140] Jagged1 se expresó en células PrE y a bajos niveles en células LNCaP. Jagged2 se expresó a bajos niveles en células LNCaP, y la expresión de Delta y Delta4 fue de baja a indetectable en los cuatro tipos de células examinadas. Esto se muestra gráficamente en la Figura 5A.

[0141] El perfil de expresión de Jagged1 se confirmó usando hibridación *in situ* (véase el Ejemplo 2 para las condiciones) con secciones prostáticas preparadas a partir del modelo de ratón TRAMP (véase el Ejemplo 5 para la descripción del modelo de ratón TRAMP). Se detectó una fuerte señal de hibridación en las células endoteliales de vasos sanguíneos en tejidos normales y de próstata malignos. No se observó señal en las células epiteliales malignas en tumores TRAMP. Estos datos se muestran en la Figura 5B.

Ejemplo 7: La activación de Notch1 conduce a una disminución en la proliferación de células de cáncer de próstata

[0142] La expresión de Notch1 se encuentra en células cancerosas, pero la expresión del ligando para Notch1 aparece relativamente baja. La activación de una señal de Notch1 puede influir en el crecimiento de células de cáncer de próstata. Se transfectaron diversas líneas de células de cáncer de próstata con una forma constitutivamente activa de Notch1, mN1-IC, que es el dominio intracelular de Notch1 de ratón. Las características de esta forma activa de Notch1 se han informado previamente (Nye y col., (1994) Development 120: 2424 – 2430). Para medir la síntesis de ADN, un número de células idéntico (4×10^3 células/pocillo) se sembró en placas de 96 pocillos en medio de cultivo de células epiteliales de próstata sin suero (PrEGM, Clonetics, Walkersville MD). En este caso, el medio PrEGM se usó sin triyodotironina, hidrocortisona, epinefrina y EGF recombinante humano. Se añadió ^3H -timidina (1 μCi /pocillo) 24 horas después de sembrar las células y se incubaron durante 21 horas. Las células se tripsinaron y luego se recogieron usando un recolector de células Tomtec. Luego se contaron las cpm/pocillo con un contador de centelleo de microplacas (Packard Instrument Company). Los datos se recogieron de 5 ó 24 pocillos de cultivo de cada uno de los grupos experimentales y se expresaron como media + /- desviación estándar. Se usó la prueba de la t para datos independientes bilateral para analizar los resultados estadísticamente.

Resultados

[0143] La expresión de la forma constitutivamente activa de Notch inhibió la síntesis de ADN en todas las líneas de células de cáncer de próstata examinadas, que incluyeron células DU145, LNCaP y PC3. Hubo una reducción estadísticamente significativa en las tasas de proliferación en 3 de las líneas de células de cáncer de próstata con respecto a aquellas transfectadas con un vector de control. Estos datos se muestran gráficamente en la Figura 6A.

Ejemplo 8: La activación de Notch conduce a la activación de CBF1

[0144] CBF1 es una proteína de unión a ADN que se ha descrito como un mediador intracelular de la señalización de Notch en mamíferos (Honjo y col., (1996) Genes Cells 1: 1 – 9). CBF1 activado por Notch1 puede conducir a la inhibición de neurogénesis (Artavanis-Tsakonas y col., (1995) Science 268: 225 – 232) y diferenciación de células de músculo (Nofziger y col., (1999) Development 126: 689 – 702). Los ensayos de luciferasa dual indican que la activación de la señalización de Notch en células LNCaP y PC3 transactiva la ruta de CBF1. Se sembraron células en una placa de cultivo de tejido de 12 pocillos y al día siguiente se co-transfectaron con la construcción CBF1-luciferasa (194 ng) y el plásmido pRL-TK (6 ng) que expresa luciferasa de Renilla, junto con 800 ng de plásmido mN1-IC o un vector de control (pDNAC3). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se ensayaron para la actividad de luciferasa dual estándar según instrucciones del fabricante (Promega, Madison WI). Los datos se expresan como medias de las unidades de luciferasa relativas y desviaciones estándares de tres experimentos independientes.

Resultados

[0145] Usando una construcción de CBF1/gen indicador de luciferasa en una co-transfección con la construcción de Notch1 activada con mN1-IC se determinó que hubo un aumento de 300 veces en la actividad de luciferasa en células PC3 cultivadas y un aumento de 1900 veces en células LNCaP cuando se comparó con transfecciones de control. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 6B.

Ejemplo 9: Expresión de Notch en *E. coli*

[0146] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma sin glucosilar de Notch por expresión recombinante en *E. coli*.

[0147] La secuencia de ADN que codifica Notch se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que se corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar y col., Gene, 2: 95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Entonces, las secuencias amplificadas por PCR se ligan en el vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor trp, un líder de poli-His (incluyendo los seis primeros codones de STII, secuencia de poli-His y sitio de escisión de enterocinasa), la región codificante de Notch, el terminador de la transcripción lambda y un gen argU.

[0148] Entonces, la mezcla de ligación se usa para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los procedimientos descritos en Sambrook y col., arriba. Los transformantes se identifican por su capacidad para cultivarse en placas LB y luego se seleccionan colonias resistentes a antibiótico. El ADN de plásmido puede aislarse y confirmarse por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

[0149] Los clones seleccionados pueden cultivarse durante la noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. El cultivo durante la noche puede usarse posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Entonces, las células se cultivan a una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de la expresión.

[0150] Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden recogerse por centrifugación. El sedimento de células obtenido por la centrifugación puede solubilizarse usando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína Notch solubilizada puede luego purificarse usando una columna quelante de metales en condiciones que permiten la estrecha unión de la proteína.

[0151] Notch puede expresarse en *E. coli* en una forma marcada con poli-His usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica Notch es inicialmente amplificado usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que se corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que se proporcionan para la eficiente y fidedigna iniciación de la traducción, rápida purificación sobre una columna de quelación de metales y eliminación proteolítica con enterocinasa. Entonces, las secuencias marcadas con poli-His amplificadas por PCR se ligan en un vector de expresión, que se usa para transformar un huésped de *E. coli* basándose en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan primero en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una D.O. a 600 de 3 – 5. Entonces, los cultivos se diluyen 50 – 100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio-2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Hy-Case SF de Sheffield en 500 ml de agua, además de MPOS 110 mM, pH 7,3, 0,55 % (peso/volumen) de glucosa y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20 – 30 horas a 30 °C con agitación. Las muestras se eliminan para verificar la expresión por análisis de SDS-PAGE y el cultivo en masa se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos de células se congelan hasta la purificación y el repliegamiento.

[0152] Pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (gránulos de 6-10 g) se resuspende en 10 volúmenes (peso/volumen) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añade sulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la disolución se agita durante la noche a 4°C. Esta etapa produce una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La disolución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3 – 5 volúmenes de tampón de columna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. El extracto clarificado se carga sobre una columna de quelato metálico de Qiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de columna de quelato metálico. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se reúnen y se guardan a 4°C. La concentración de proteína se estima por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

[0153] Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en tampón de repliegado recientemente preparado que consiste en Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de repliegamiento se eligen de manera que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La disolución de repliegamiento se agita cuidadosamente a 4 °C durante 12 – 36 horas. La reacción de repliegamiento se inactiva mediante la adición de TFA a una concentración final del 0,4 % (pH de aproximadamente 3). Antes de purificarse más la proteína, la disolución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo al 2 – 10 % de concentración final. La proteína repliegada se purifica por cromatografía sobre una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil del 0,1 % de TFA con

elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80 %. Las alícuotas de fracciones con absorbancia A280 se analizan sobre geles de SDS-poliacrilamida y se reúnen las fracciones que contienen proteína plegada homogénea. Generalmente, las especies apropiadamente plegadas de la mayoría de las proteínas se eluyen a las menores concentraciones de acetonitrilo, ya que aquellas especies son las más compactas con sus interiores

5 hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen normalmente a mayores concentraciones de acetonitrilo. Además de resolver formas de plegamiento inadecuado de proteínas a partir de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina endotoxina de las muestras.

[0154] Las fracciones que contienen el polipéptido Notch plegado deseado se reúnen y el acetonitrilo se elimina usando una corriente suave de nitrógeno dirigida en la disolución. Las proteínas se formulan en HEPES 20

10 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y 4 % de manitol por diálisis o por filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y esterilizadas por filtración.

Ejemplo 10: Expresión de Notch en células de mamífero

[0155] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de Notch por expresión recombinante en células de mamífero.

15 [0156] El vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989) se emplea como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de Notch está ligado en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de Notch usando procedimientos de ligación tal como se describen en Sambrook y col., arriba. El vector resultante se llama pRK5.Notch.

[0157] En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Se cultivan células 293

20 humanas (ATCC CCL 1573) a confluencia en placas de cultivo de tejido en medio tal como DMEM complementado con suero bovino fetal y opcionalmente componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-Notch se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN de VA [Thimmappaya y col., Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM, y se permite que se

25 forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja que sedimenten durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se elimina por aspiración y se añaden 2 ml de 20 % de glicerol en PBS durante 30 segundos. Entonces, las células 293 se lavan con medio libre de suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

[0158] Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se elimina y se sustituye

30 con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, el medio acondicionado se recoge, se concentra en un filtro de centrífuga y se carga sobre 15 % de gel de SDS. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido Notch. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse adicionalmente a incubación (en medio libre de suero) y el medio se prueba en

35 bioensayos seleccionados.

[0159] En una técnica alternativa, Notch puede introducirse transitoriamente en células 293 usando el procedimiento de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Se cultivan células 293 a densidad máxima en una matriz de centrífuga y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-Notch. Las células se concentran primero a partir del matraz de centrífuga por centrifugación y se lavan con PBS. El

40 precipitado de ADN-dextrano se incuba sobre el sedimento de células durante cuatro horas. Las células se tratan con 20 % de glicerol durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido y se reintroducen en el matraz de centrífuga que contiene medio de cultivo de tejido, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar células y residuos. La muestra que contiene Notch expresado puede luego concentrarse y purificarse por cualquier

45 procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

[0160] En otra realización, Notch puede expresarse en células CHO. pRK5-Notch puede transfectarse en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio sustituirse con medio de cultivo (solo) o medio que contiene una radiomarca tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido Notch, el medio de cultivo

50 puede reemplazarse con medio libre de suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y luego se recoge el medio acondicionado. El medio que contiene Notch expresado puede luego concentrarse y purificarse por cualquier procedimiento seleccionado.

[0161] Notch marcado con epítipo también puede expresarse en células CHO huésped. Notch puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclon puede someterse a PCR para fusionarse en marco con

55 una marca seleccionada de epítipo tal como una marca de poli-His en un vector de expresión de baculovirus. El inserto de Notch marcado con poli-His puede luego subclonarse en un vector accionado por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se ha descrito anteriormente) con el vector accionado por SV40. El marcado puede realizarse,

como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene Notch marcado con poli-His expresado puede luego concentrarse y purificarse por cualquier procedimiento seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad por quelato de Ni^{2+} .

[0162] Notch también puede expresarse en células CHO y/o COS por un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

[0163] La expresión estable en células CHO se realiza usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas están fusionadas con una secuencia de la región constante de IgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con poli-His.

10 **[0164]** Tras la amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO usando técnicas convencionales como se describen en Ausubel y col., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el barajado conveniente de ADNc. El vector de expresión usado en células CHO es como se describe en Lucas y col., Nucl. Acids Res. 24: 9 (1774 – 1779 (1996), y
15 usa el promotor temprano/potenciador del SV40 para accionar la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección del mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0165] Doce microgramos del ADN de plásmido deseado se introducen en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección comercialmente disponibles Superfect® (Qiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas y col., arriba.
20 Aproximadamente 3×10^7 células se congelan en una ampolla para el crecimiento y la producción adicional como se describe a continuación.

[0166] Las ampollas que contienen el ADN de plásmido se descongelan colocando en baño de agua y se mezclan por agitación con vórtex. El contenido se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se
25 centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado en 0,2 μm con 5 % de suero bovino fetal diafiltrado en 0,2 μm). Entonces, las células se toman en alícuotas en una centrifuga de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1 – 2 días, las células se transfieren a una centrifuga de 250 ml cargada con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37 °C. Después de otros 2 – 3 días, centrifugadoras de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con 3×10^5
30 células/ml. El medio de células se intercambia con medio fresco por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio de CHO adecuado, actualmente puede usarse un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. nº 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Una centrifuga de producción de 3 l se siembra a $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0 se determina el número de células y el pH. En el día 1, la centrifuga se muestrea y comienza el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, la centrifuga se muestrea, la
35 temperatura se desplaza a 33 °C y se toman 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de 10 % de antiespumante (por ejemplo, 35 % de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365, emulsión de calidad médica). Durante toda la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70 %, el cultivo celular se recoge por centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado tanto se guardó a 4 °C como se cargó inmediatamente sobre columnas para la
40 purificación.

[0167] Para las construcciones marcadas con poli-His, las proteínas se purifican usando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación se añade imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea sobre una columna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada en HEPES 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4 – 5 ml/min a 4 °C. Después de la carga, la
45 columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene HEPES 10 mM, NaCl 0,14 M y 4 % de manitol, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se guarda a -80 °C.

[0168] Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir del medio acondicionado del siguiente modo. El medio acondicionado se bombea sobre una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha
55 descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa por geles de SDS-poliacrilamida y por secuenciación de aminoácidos del extremo N por degradación de Edman.

Ejemplo 11: Expresión de Notch en levadura

[0169] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de Notch en levadura.

[0170] Primero, se construyen vectores de expresión de levadura para la producción o secreción intracelular de Notch del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica Notch y el promotor se insertan en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de Notch. Para la secreción, el ADN que codifica Notch puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de Notch nativo u otro péptido señal de mamífero o, por ejemplo, una señal secretora/secuencia líder de factor alfa o de invertasa de levadura, y secuencias de ligador (si se necesitan) para la expresión de Notch.

[0171] Células de levadura, tales como la cepa de levadura AB 110, pueden luego transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con 10 % de ácido tricloroacético y separación por SDS-PAGE, seguido de tinción de los geles con tinción con azul de Coomassie.

[0172] Notch recombinante puede aislarse y purificarse posteriormente eliminando las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y luego concentrando el medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene Notch puede purificarse adicionalmente usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

Ejemplo 12: Expresión de Notch en células de insecto infectadas por baculovirus

[0173] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de Notch en células de insecto infectadas por baculovirus.

[0174] La secuencia que codifica Notch está fusionada en la dirección 5' de una marca de epítipo contenida dentro de un vector de expresión de baculovirus. Tales marcas de epítopos incluyen marcas de poli-His y marcas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Puede emplearse una variedad de plásmidos, que incluyen plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica Notch o la porción deseada de la secuencia codificante de Notch, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones de 5' y 3'. El cebador de 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). Entonces, el producto se digiere con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

[0175] El baculovirus recombinante se genera por co-transfección del plásmido anterior y ADN de virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de 4 – 5 días de incubación a 28 °C, los virus liberados se recogen y se usan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de proteínas se realizan como se describe por O'Reilley y col., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

[0176] Entonces, Notch marcado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, por cromatografía de afinidad por quelato de Ni^{2+} del siguiente modo. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe por Rupert y col., Nature, 362: 175 – 179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de sonicación (HEPES 25 mM, pH 7,9; MgCl_2 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; 10 % de glicerol; 0,1 % de NP-40; KCl 0,4 M) y se sonicán dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, 10 % de glicerol, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm . Se prepara una columna de Ni^{2+} -NTA agarosa (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto de células filtradas se carga sobre la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava a la A_{280} del nivel inicial con tampón de carga, en cuyo momento empieza la recogida de fracciones. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, 10 % de glicerol, pH 6,0), que eluye la proteína no específicamente unida. Después de alcanzar de nuevo el nivel inicial de A_{280} , la columna se revela con un gradiente de imidazol del 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni^{2+} -NTA-conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen Notch marcado con His_{10} eluido se reúnen y se dializan contra tampón de carga.

[0177] Alternativamente, la purificación de Notch marcado con IgG (o marcado con Fc) puede realizarse usando técnicas cromatográficas conocidas que incluyen, por ejemplo, cromatografía en columna de proteína A o proteína G.

Ejemplo 13: Preparación de anticuerpos que se unen a Notch

[0178] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a Notch.

[0179] Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica y se describen, por

ejemplo, en Goding, arriba. Los inmunógenos que pueden emplearse incluyen Notch purificado, proteínas de fusión que contienen Notch y células que expresan Notch recombinante sobre la superficie celular. El experto puede hacer la selección del inmunógeno sin experimentación adicional.

[0180] Ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno Notch emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyectan subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1 – 100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. Entonces, los ratones inmunizados se refuerzan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después, durante varias semanas, los ratones también pueden reforzarse con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero pueden obtenerse periódicamente de los ratones por sangrado retro-orbital para probar en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-Notch.

[0181] Después de detectarse un título de anticuerpos adecuado, los animales “positivos” para los anticuerpos pueden inyectarse con una inyección intravenosa final de Notch. Tres a cuatro días después, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. Entonces, las células del bazo se fusionan (usando 35 % de polietilenglicol) con una línea de células de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponible de ATCC nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que luego pueden sembrarse en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

[0182] Las células de hibridoma se cribarán en un ELISA para reactividad contra Notch. La determinación de células de hibridoma “positivas” que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra Notch está dentro de la habilidad en la materia.

[0183] Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singéneos para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-Notch. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse en matraces de cultivo de tejido o botellas rotatorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis puede llevarse a cabo usando precipitación con sulfato de amonio, seguida de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente puede emplearse la cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a proteína A o proteína G.

Ejemplo 14: Purificación de polipéptidos Notch usando anticuerpos específicos

[0184] Polipéptidos Notch nativos o recombinantes pueden purificarse mediante una variedad de técnicas convencionales en la materia de la purificación de proteínas. Por ejemplo, polipéptido pro-Notch, polipéptido Notch maduro o polipéptido pre-Notch se purifican por cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido Notch de interés. En general, una columna de inmutafinidad se construye acoplando covalentemente el anticuerpo anti-polipéptido Notch con una resina cromatográfica activada.

[0185] Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunes tanto por precipitación con sulfato de amonio como por purificación sobre proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico de ratón por precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava según las instrucciones del fabricante.

[0186] Una columna de inmutafinidad tal se utiliza en la purificación de polipéptido Notch preparando una fracción de células que contienen polipéptido Notch en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida por centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o por otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido Notch soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en cantidad útil en el medio en el que las células se cultivan.

[0187] Una preparación que contiene polipéptido Notch soluble se pasa por una columna de inmutafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido Notch (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Entonces, la columna se eluye en condiciones que rompen la unión anticuerpo/polipéptido Notch (por ejemplo, un tampón de bajo pH tal como aproximadamente pH 2-3, o una alta concentración de un caótrolo tal como urea o ión tiocianato) y se recoge el polipéptido Notch.

Ejemplo 15: Cribado de fármacos

[0188] La presente invención es particularmente útil para cribar compuestos usando polipéptidos Notch o fragmento de unión del mismo en cualquiera de una variedad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido Notch o fragmento empleado en una prueba tal puede estar tanto libre en disolución, fijado a un soporte sólido, soportado sobre una superficie celular como localizado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos

utiliza células huésped eucariotas o procariotas que están establemente transformadas con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido Notch o fragmento. Los fármacos se criban contra tales células transformadas en ensayos de unión competitiva. Tales células, tanto en forma viable como fijada, pueden usarse para ensayos de unión convencionales. Puede medirse, por ejemplo, la formación de complejos entre polipéptido

5 Notch o un fragmento y el agente que se prueba. Alternativamente, puede examinarse la disminución en la formación de complejos entre el polipéptido Notch y su célula diana o receptores diana producidos por el agente que se prueba.

[0189] Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos de cribado de fármacos o cualquier otro agente que pueda afectar una enfermedad o trastorno asociado al polipéptido Notch. Estos procedimientos

10 comprenden poner en contacto un agente tal con un polipéptido Notch o fragmento del mismo y ensayar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido Notch o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido Notch o fragmento y la célula, mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. En tales ensayos de unión competitiva, el polipéptido Notch o fragmento está normalmente marcado. Después de la incubación adecuada, el polipéptido Notch libre o fragmento se separa del presente en forma unida, y la cantidad de marca libre

15 o sin complejar es una medida de la capacidad del agente particular para unirse a polipéptido Notch o para interferir con el complejo polipéptido Notch/célula.

[0190] Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona cribado de alto rendimiento para compuestos que tienen afinidad de unión adecuada por un polipéptido y se describe en detalle en el documento WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Brevemente establecido, números mayores de compuestos de prueba de

20 péptidos pequeños diferentes se sintetizan sobre un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Como se aplica a un polipéptido Notch, los compuestos de prueba de péptido se hacen reaccionar con polipéptido Notch y se lavan. El polipéptido Notch unido se detecta mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. El polipéptido Notch purificado también puede recubrirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente mencionadas. Además, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes

25 para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

[0191] La presente invención también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes que pueden unirse al polipéptido Notch compiten específicamente con un compuesto de prueba para unirse al polipéptido Notch o fragmentos del mismo. De este modo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos

30 con el polipéptido Notch.

Ejemplo 16: Diseño racional de fármacos

[0192] El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptido biológicamente activo de interés (es decir, un polipéptido Notch) o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos puede usarse para

35 crear fármacos que son formas más activas o estables del polipéptido Notch o que potencian o interfieren con la función del polipéptido Notch *in vivo* (véase Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19 – 21 (1991)).

[0193] En un enfoque, la estructura tridimensional del polipéptido Notch, o de un inhibidor del complejo del polipéptido Notch, se determina por cristalografía de rayos X, por modelado informático o, lo más normalmente, por una combinación de los dos enfoques. Tanto la forma como las cargas del polipéptido Notch deben determinarse

40 para elucidar la estructura y para determinar sitio(s) activo(s) de la molécula. Menos frecuentemente, información útil referente a la estructura del polipéptido Notch puede obtenerse modelando basándose en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos se usa información estructural relevante para diseñar moléculas similares a polipéptido Notch análogas o para identificar inhibidores eficientes. Ejemplos útiles de diseño racional de fármacos pueden incluir moléculas que tienen actividad o estabilidad mejorada como se muestra por Braxton y Wells, *Biochemistry*,

45 31: 7796 – 7801 (1992) o que actúan de inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos como se muestra por Athauda y col., *J. Biochem.*, 113: 742 – 746 (1993).

[0194] También es posible aislar un anticuerpo específico para diana seleccionado por ensayo funcional, como se ha descrito anteriormente, y luego resolver su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, da un farmacóforo en el que puede basarse el posterior diseño de fármacos. Es posible evitar totalmente la cristalografía

50 de proteínas generando anticuerpos *antidiotípicos* (anti-ids) para un anticuerpo farmacológicamente activo funcional. Como una imagen especular de una imagen especular, se esperaría que el sitio de unión de los anti-ids fuera un análogo del receptor original. Entonces, el anti-id podría usarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos químicamente o biológicamente producidos. Entonces, los péptidos aislados actuarían de farmacóforo.

[0195] En virtud de la presente invención pueden prepararse cantidades suficientes del polipéptido Notch disponibles para realizar tales estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la

55 secuencia de aminoácidos del polipéptido Notch proporcionada en el presente documento proporcionará orientación a aquellos que emplean técnicas de modelado informático en lugar de o además de cristalografía de rayos X.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o un agonista de un receptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1 para la fabricación de un medicamento para el alivio de cáncer de próstata en un mamífero.
- 5 2. Forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o un agonista de un receptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1 para su uso en el alivio de cáncer de próstata en un mamífero.
3. Procedimiento *in vitro* de disminución de la proliferación de células prostáticas que expresan el receptor Notch1 que comprende poner en contacto el receptor Notch1 con un agonista de un receptor Notch1 que es un anticuerpo anti-receptor Notch1, por lo que se activa dicho receptor Notch1 y disminuye la proliferación de dichas
10 células prostáticas.
4. Uso de la reivindicación 1, anticuerpo para el uso de la reivindicación 2 o procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
5. Uso o procedimiento de la reivindicación 4, o anticuerpo para el uso de la reivindicación 4, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.
- 15 6. Uso de la reivindicación 1, o forma constitutivamente activa del receptor Notch1 o anticuerpo para el uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer de próstata está seleccionado de adenocarcinoma de próstata y cáncer de próstata metastásico.
7. Uso de la reivindicación 1 o forma constitutivamente activa del receptor Notch1 para el uso de la reivindicación 2, en el que la forma constitutivamente activa del receptor Notch1 es una forma truncada de ECD del
20 receptor Notch1.
8. Procedimiento de diagnóstico de cáncer de próstata en un mamífero que comprende poner en contacto una muestra biológica que ha sido obtenida de la próstata de dicho mamífero con una sonda del receptor Notch y determinar el nivel de expresión de un receptor Notch1 en dicha muestra, en el que el aumento de la expresión del receptor Notch1 con respecto a tejido de próstata normal es indicativo de la presencia de dicho cáncer
25 prostático.
9. Procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha sonda del receptor Notch1 es una sonda de ácido nucleico.
10. Procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha sonda del receptor Notch1 es una sonda de anticuerpo.
- 30 11. Procedimiento *in vitro* de cribado de compuestos para el tratamiento de cáncer de próstata, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto células que expresan el receptor Notch1 con un compuesto candidato, determinar la activación de dicho receptor Notch1 e identificar un compuesto que activa el receptor Notch1.
12. Procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho compuesto candidato comprende un anticuerpo
35 anti-receptor Notch1.
13. Procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho compuesto candidato está seleccionado del grupo que consiste en Jagged1, Jagged2, Delta y Delta4.

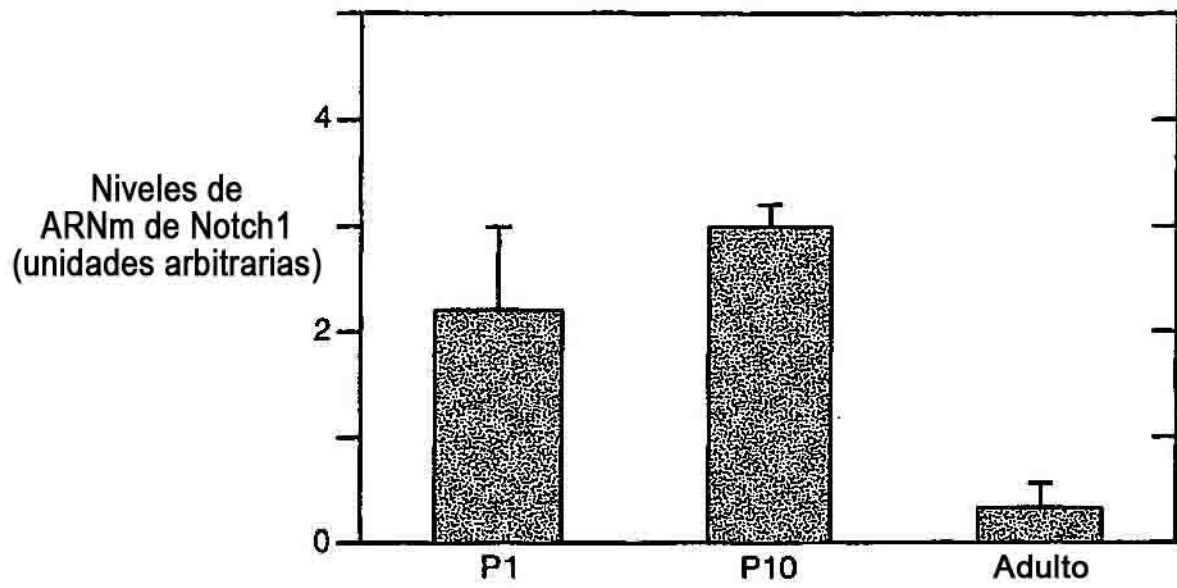


FIG._1A

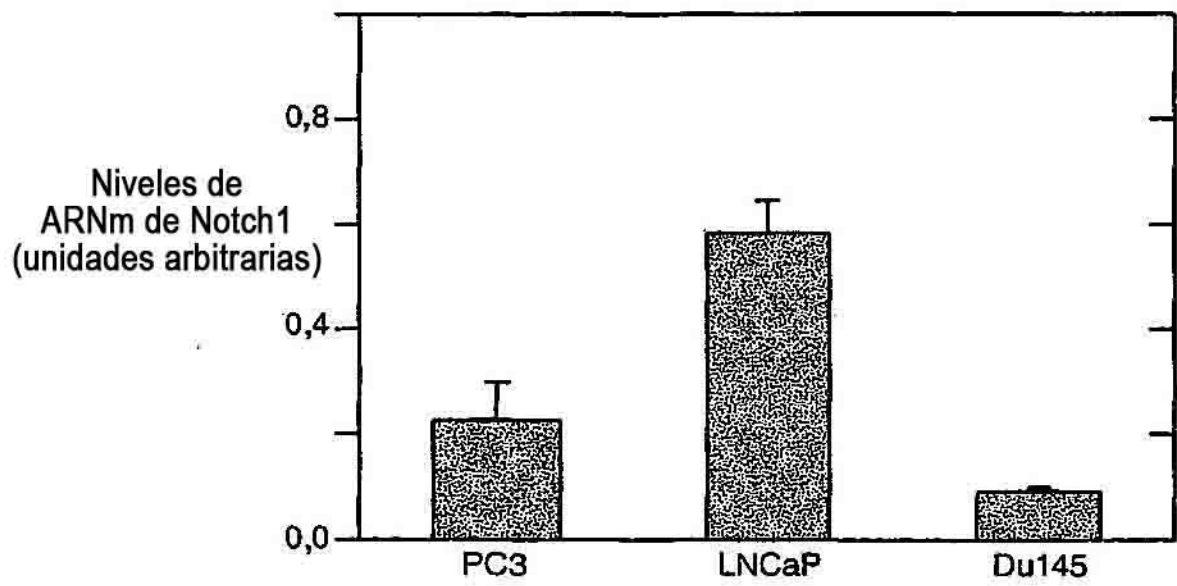


FIG._3

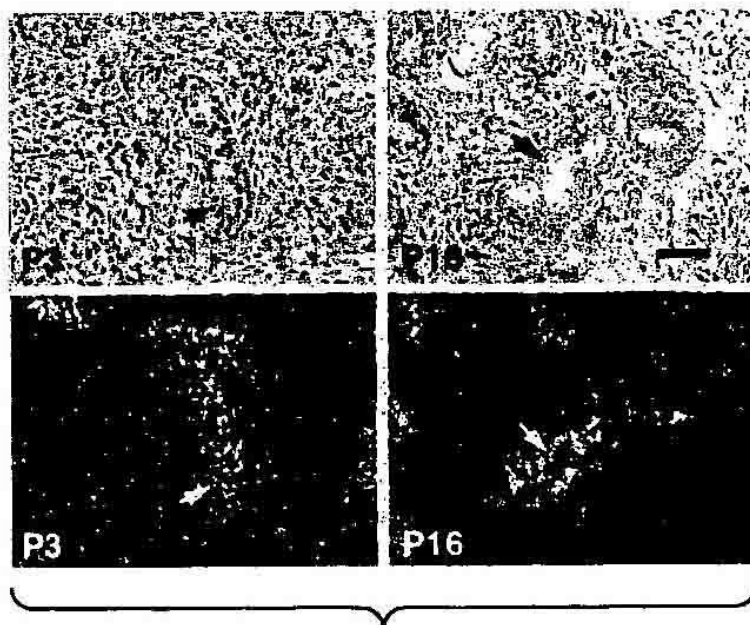


FIG._1B

FIG._2A

FIG._2B

FIG._2C

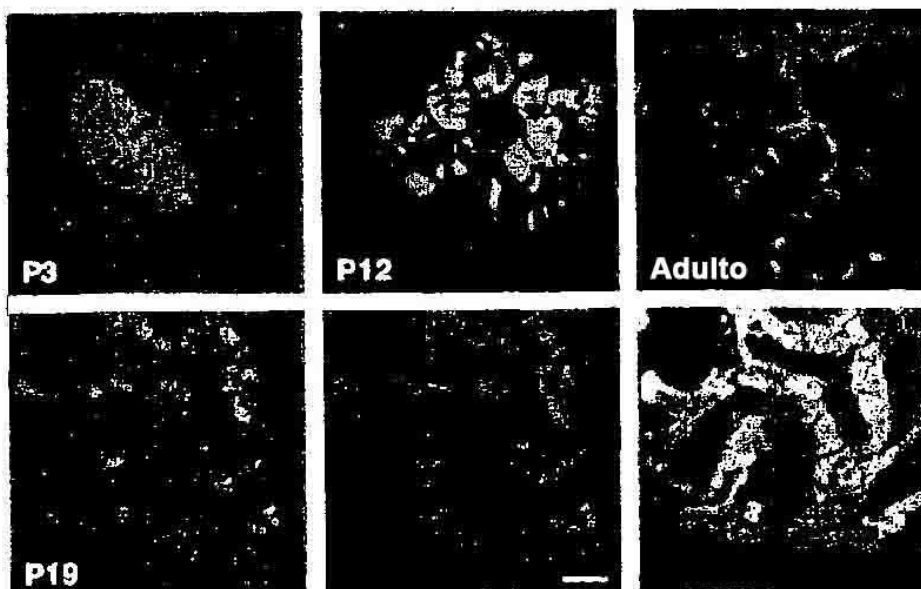


FIG._2D-1 FIG._2D-2 FIG._2D-3

FIG._4A

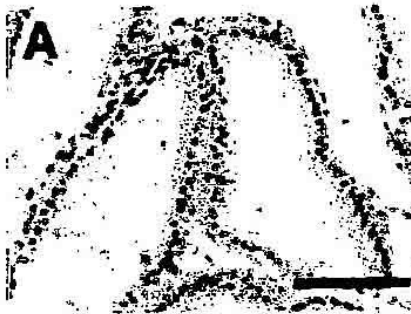


FIG._4B

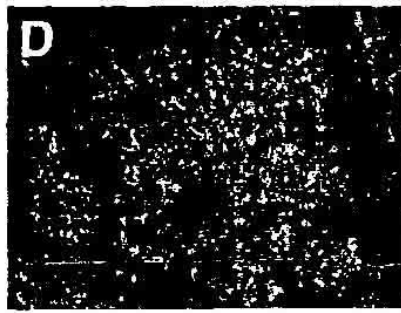


FIG._4C

FIG._4D

FIG._4E

FIG._4F

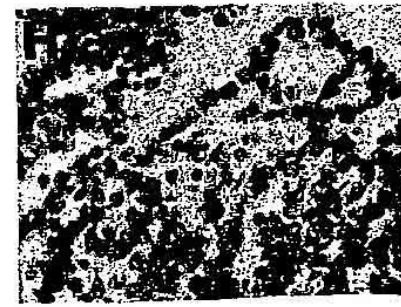
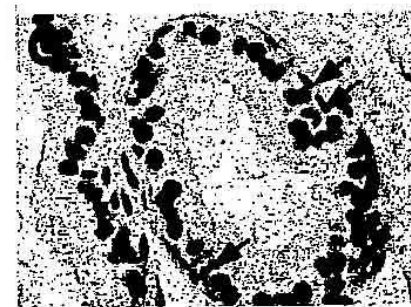
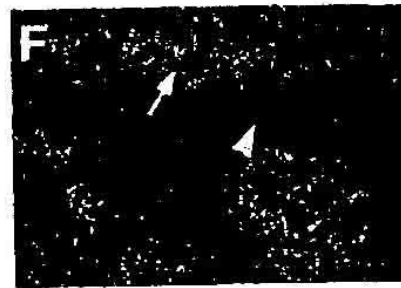
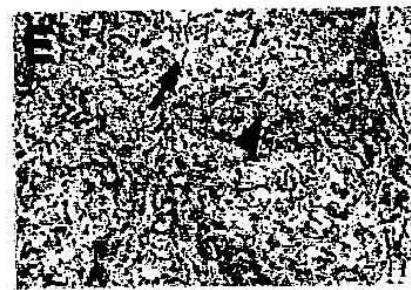


FIG._4G

FIG._4H

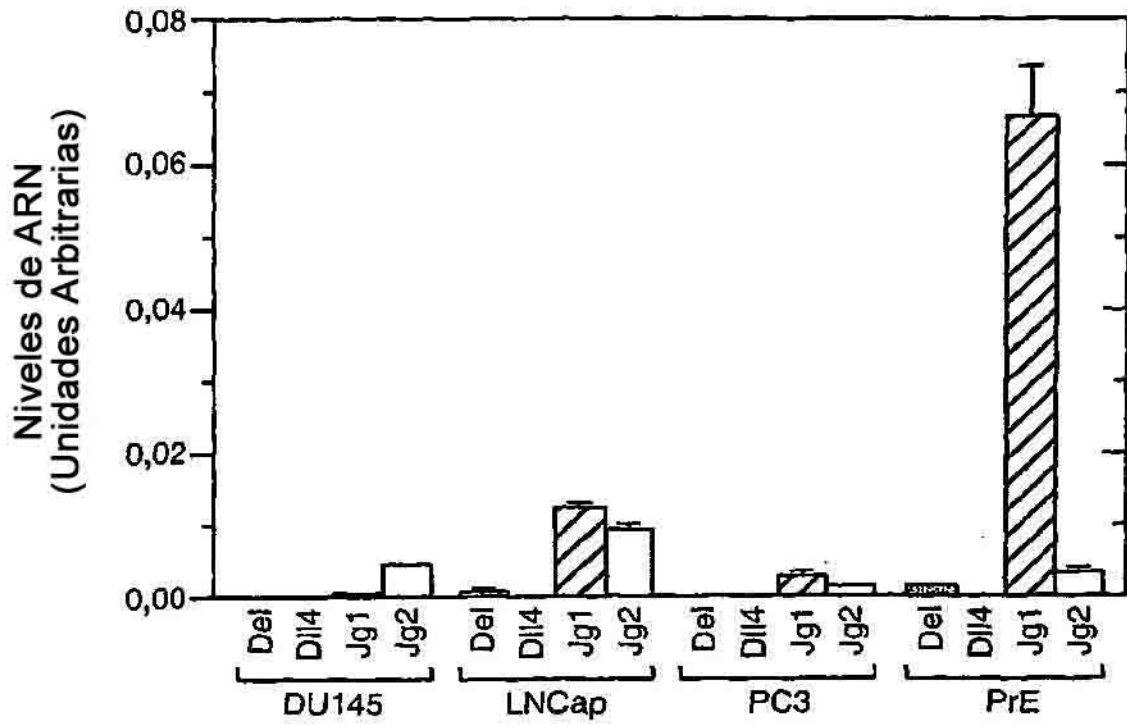


FIG._5A

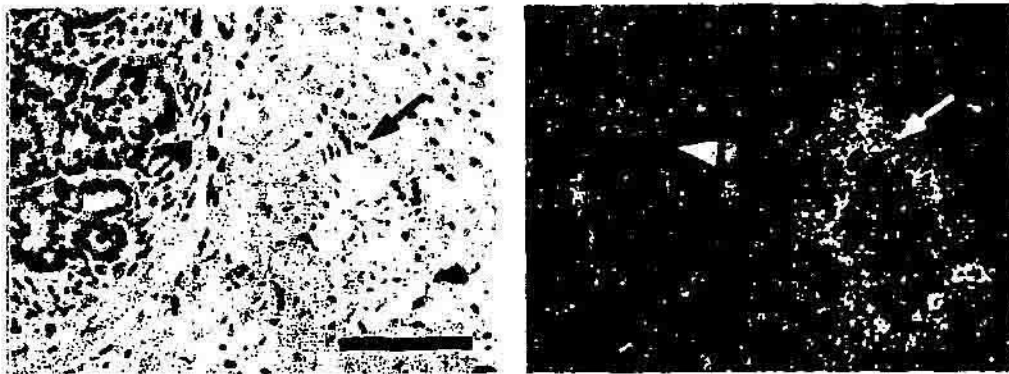


FIG._5B

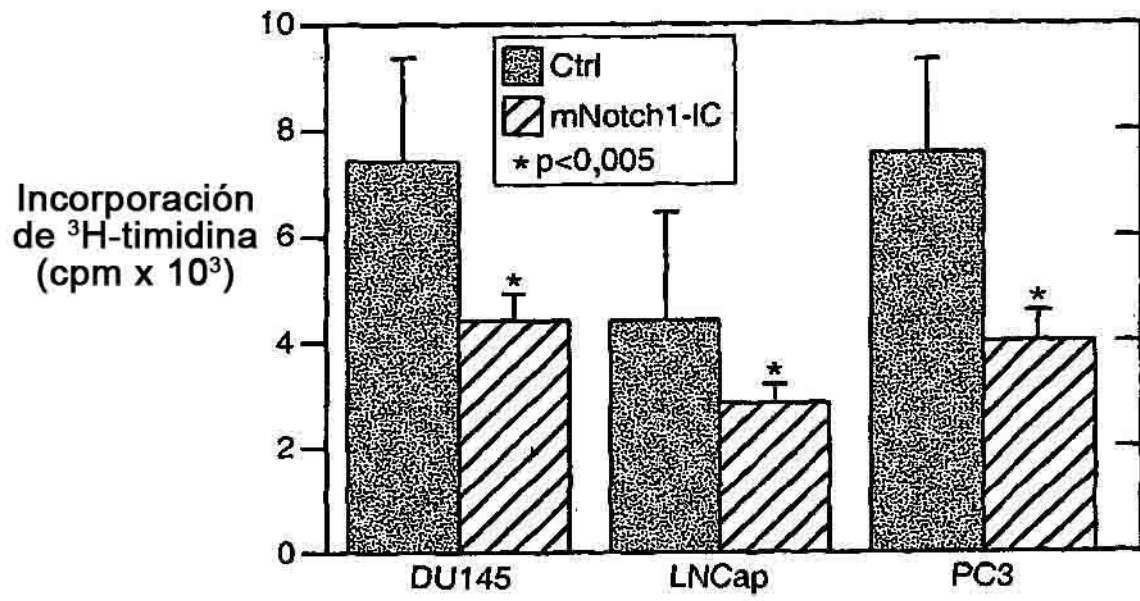


FIG..6A

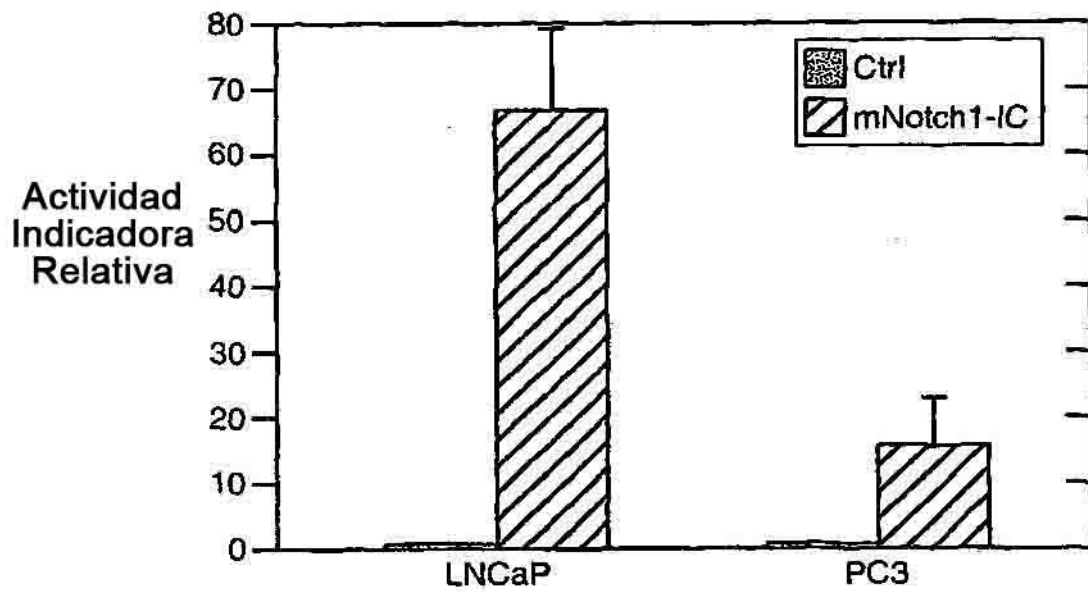


FIG..6B