

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 087**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2007 E 07777332 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2032166**

54 Título: **Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

13.06.2006 US 812955 P

05.01.2007 US 878661 P

09.01.2007 US 879336 P

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

15.07.2013

73 Titular/es:

**ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 CHESAPEAKE DRIVE
REDWOOD CITY, CA 94053, US**

72 Inventor/es:

**LEWICKI, JOHN;
GURNEY, AUSTIN;
HOEY, TIMOTHY;
YEN, WAN-CHING y
SATYAL, SANJEEV**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 413 087 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

Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a composiciones que se pueden utilizar para la caracterización, diagnóstico, y tratamiento del cáncer. La composición según la presente invención se puede utilizar en métodos para el diagnóstico, la caracterización, el pronóstico y el tratamiento del cáncer y específicamente que reconocen las células madre de cáncer.

15 Antecedentes de la técnica

[0002] El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado, lo que resulta en más de 500.000 muertes por año en los Estados Unidos solamente. Más de un millón de personas son diagnosticadas con cáncer cada año en los EE.UU., y en general se estima que más de 1 de cada 3 personas desarrollarán algún tipo de cáncer durante su vida. Aunque hay más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de ellos, mama, pulmón, colon y próstata, representan más de la mitad de todos los casos nuevos (Jemal et al, Cancer J. Clin. 53:5-26 (2003)).

25 [0003] El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la mujer, con una estimación del 12% de las mujeres en riesgo de desarrollar la enfermedad durante su vida. Aunque las tasas de mortalidad han disminuido debido a la detección temprana y la mejora de los tratamientos, el cáncer de mama sigue siendo la principal causa de muerte en mujeres de mediana edad. Además, el cáncer de mama metastásico sigue siendo una enfermedad incurable. En la presentación, la mayoría de los pacientes con cáncer de mama metastásico tienen sólo uno o dos sistemas de órganos afectados, pero a medida que la enfermedad progresa, normalmente se involucran múltiples sitios. Los sitios más frecuentes de afectación metastásica son recurrencias locorregionales en la piel y tejidos blandos de la pared torácica, así como en la axila y áreas supraclaviculares. El sitio más común para la metástasis a distancia es el hueso (30-40% de metástasis a distancia), seguido de los pulmones y el hígado. Y aunque sólo aproximadamente el 1-5% de las mujeres con cáncer de mama recién diagnosticadas tienen metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, aproximadamente el 50% de los pacientes con enfermedad local finalmente recaen con metástasis en cinco años. En la actualidad, la media de supervivencia desde la manifestación de metástasis a distancia es de aproximadamente tres años.

35 [0004] Los métodos actuales de diagnóstico y estadificación del cáncer de mama incluyen el sistema de metástasis de nódulos tumorales (TNM) que se basa en el tamaño del tumor, la presencia de tumor en los ganglios linfáticos, y la presencia de metástasis a distancia como se describe en el American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, Pa.: Editores Lippincott-Raven, 5^a ed, 1997, pp 171-180, y en Harris, JR.: "Staging of breast carcinoma", en Harris, Jr., Hellman, S. L, Henderson, C5 Kinne (DW eds): Breast Diseases. Philadelphia, Lippincott, 1991. Estos parámetros se utilizan para proporcionar un pronóstico y seleccionar una terapia adecuada. El aspecto morfológico del tumor también puede ser evaluado, pero debido a los tumores con apariencia histopatológica similares pueden presentar variabilidad clínica significativa, esta estrategia tiene serias limitaciones. Finalmente se pueden utilizar ensayos para marcadores de superficie celular para dividir ciertos tipos de tumores en subclases. Por ejemplo, uno de los factores considerados en el pronóstico y el tratamiento del cáncer de mama es la presencia del receptor de estrógeno (ER) como los cánceres de mama ER-positivos suelen responder más fácilmente a las terapias hormonales como el tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa que los tumores ER-negativos. Sin embargo, estos análisis, aunque útiles, son sólo parcialmente predictivos del comportamiento clínico de los tumores de mama, y hay mucha diversidad fenotípica presente en los cánceres de mama que las herramientas de diagnóstico actuales no pueden detectar y las terapias actuales no tratan.

50 [0005] El cáncer de próstata es el cáncer más común en los hombres en el mundo desarrollado, lo que representa aproximadamente el 33% de todos los nuevos casos de cáncer en los EE.UU., y es la segunda causa de muerte más frecuente (Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26). Desde la introducción del test de sangre con antígeno prostático específico (PSA), la detección precoz del cáncer de próstata ha mejorado dramáticamente las tasas de supervivencia y la tasa de supervivencia de cinco años para los pacientes con cáncer de próstata en etapa locales y regionales en el momento del diagnóstico se acerca al 100%. Sin embargo, más de 50% de los pacientes finalmente desarrollarán la enfermedad localmente avanzada o metastásica (Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16).

60 [0006] En la actualidad la prostatectomía radical y la terapia de radiación proporcionan tratamiento curativo para la mayoría de los tumores de próstata localizados. Sin embargo, las opciones terapéuticas son muy limitadas para los casos avanzados. Para la enfermedad metastásica, la ablación de andrógenos con el agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) solo o en combinación con anti-andrógenos es el tratamiento estándar. Sin embargo, a pesar de la máxima obstrucción de andrógenos, la enfermedad progresa casi siempre con la mayoría de la enfermedad independiente del desarrollo de andrógenos. En la actualidad no existe un tratamiento

uniformemente aceptado para el cáncer de próstata refractario a hormonas, y se utilizan habitualmente regímenes quimioterapéuticos (Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16; Trojan et al, 2005, Anticancer Res. 25:551-61).

5 [0007] El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común y la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer en todo el mundo (Weitz et al., 2005, The Lancet 365:153-65). Aproximadamente el 5-10% de todos los cánceres colorrectales son hereditarios con una de las principales formas siendo la poliposis adenomatosa familiar (PAF), una enfermedad autosómica dominante en la que aproximadamente el 80% de los individuos afectados contiene una mutación de línea germinal en el gen de *adenomatous polyposis coli* (APC). El carcinoma colorrectal tiene una
10 tendencia a invadir localmente mediante crecimiento circunferencial y en otros lugares mediante extensión linfática, hematológica, transperitoneal, y perineural. El sitio más común de implicación extralinfática es el hígado, siendo los pulmones el órgano extra-abdominal más frecuentemente afectado. Otros lugares de expansión hematológica incluyen los huesos, los riñones, las glándulas suprarrenales y el cerebro.

15 [0008] El sistema de estadificación actual para el cáncer colorrectal se basa en el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de implicación nodal. Este sistema de estadificación se define por tres clasificaciones principales de Duke: la enfermedad A de Duke está confinada a las capas de la submucosa del colon o del recto; la enfermedad B de Duke tiene tumores que invaden a través de la muscularis propia y pueden penetrar la pared del colon o del recto; y la enfermedad C de Duke incluye cualquier grado de invasión de la
20 pared intestinal con metástasis regional de ganglios linfáticos. Si bien la resección quirúrgica es altamente eficaz para cánceres colorectales en fase inicial, proporcionando tasas de curación de 95% en los pacientes de Duke A, la tasa se reduce al 75% en los pacientes de Duke B y la presencia de ganglios linfáticos positivos en la enfermedad C de Duke predice una probabilidad del 60% de recaída en de cinco años. El tratamiento de los pacientes de Duke C con una evolución postoperatoria de quimioterapia reduce la tasa de recurrencia al 40%-50%, y ahora es el estándar de atención para estos pacientes.

[0009] El cáncer de pulmón es el cáncer más común en todo el mundo, el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado en los Estados Unidos, y con mucho, la causa más frecuente de muerte por cáncer (Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-96; Jemal et al, 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26). El tabaquismo se
30 considera responsable de forma estimada del 87% de todos los cánceres de pulmón, por lo que es la enfermedad mortal más prevenible. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales que representan más del 90% de todos los cánceres de pulmón: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). SCLC representa el 15 - 20% de los casos y se caracteriza por su origen en las vías respiratorias centrales amplias y composición histológica de láminas de pequeñas células con poco citoplasma. SCLC es más agresivo que el NSCLC, de rápido crecimiento y metástasis temprana y con frecuencia. NSCLC
35 representa el 80 - 85% de todos los casos y se divide en tres subtipos principales en base a la histología: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), y carcinoma no diferenciado de células grandes.

40 [0010] El cáncer de pulmón habitualmente se presenta tarde en su evolución y, de este modo, tiene una supervivencia media de sólo 6 a 12 meses después del diagnóstico y una tasa de supervivencia global a los 5 años de sólo el 5-10%. Aunque la cirugía ofrece la mejor oportunidad de una cura, sólo una pequeña fracción de los pacientes con cáncer de pulmón son elegibles con la mayoría dependiendo de la quimioterapia y la radioterapia. A pesar de los intentos de manipular el tiempo y la intensidad de la dosis de estos tratamientos, las tasas de supervivencia han aumentado mucho en los últimos 15 años (Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-96).

[0011] El cáncer se origina a partir de la desregulación de los mecanismos que controlan el desarrollo y el mantenimiento del tejido normal, y cada vez más se cree que las células madre desempeñan un papel central (Beachy et al., 2004, Nature 432:324). Durante el desarrollo normal de los animales, las células de la mayoría o todos los tejidos se derivan de precursores normales, llamadas células madre (Morrison et al, 1997, Cell, 88:287-98;. Morrison et al, 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:216-21; Morrison et al, 1995, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11:35-71). Las células madre son células que: (1) tienen una amplia capacidad proliferativa; 2) son capaces de la división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie con reducido potencial proliferativo y/o de desarrollo, y (3) son
55 capaces de divisiones celulares simétricas para la auto-renovación o auto-mantenimiento. El ejemplo mejor conocido de la renovación de las células adultas mediante la diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético en el que precursores en desarrollo inmaduros (células madre y progenitoras hematopoyéticas) responden a señales moleculares para formar los tipos de células variadas de sangre y linfoides. Otras células, incluyendo las células del intestino, sistema ductal de mama, y la piel se reponen constantemente a partir de una pequeña población de células madre en cada tejido, y estudios recientes sugieren que la mayoría de otros tejidos adultos también albergan células madre, incluyendo el cerebro.

[0012] Los tumores sólidos se componen de poblaciones de células heterogéneas. Por ejemplo, los cánceres de mama son una mezcla de células cancerosas y células normales, incluyendo células mesenquimales (estromales), células inflamatorias y células endoteliales. Los modelos clásicos de cáncer mantienen que las poblaciones celulares de cáncer fenotípicamente distintas tienen todas la capacidad de proliferar y dar lugar a un nuevo tumor. En el
65

modelo clásico, la heterogeneidad de las células tumorales resulta de factores ambientales, así como mutaciones en desarrollo en las células cancerosas dando como resultado una población diversa de células tumorigénicas. Este modelo se basa en la idea de que todas las poblaciones de células tumorales tendrían algún grado de potencial tumorigénico. (Pandis et al, 1998, Genes, Chromosomes and Cancer; 12:122-129. Kuukasjrvi et al, 1997, Cancer Res. 57:1597-1604; Bonsing et al, 1993, Cancer 71:382-391; Bonsing et al, 2000, Genes, Chromosomes and Cancer 82: 173-183; Beerman H et al, 1991, Cytometry. 12:147-54; Aubele M & M Werner, 1999, Analyt. Cell. Path. 19:53; Shen L et al, 2000, Cancer Res. 60:3884).

[0013] Un modelo alternativo para la heterogeneidad de las células tumorales sólidas observadas es que los tumores sólidos resultado de una "célula madre tumoral sólida" (o "células madre del cáncer" de un tumor sólido), posteriormente experimentan un desarrollo caótico a través de rondas tanto simétricas como asimétricas de divisiones celulares. En este modelo de células madre, los tumores sólidos contienen un subconjunto distinto y limitado (posiblemente incluso raro) de las células que comparten las propiedades de "células madre" normales, en que proliferan ampliamente y dan lugar de manera eficiente a células madre tumorales sólidas adicionales (autorenovación) y a la mayoría de células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. De hecho, las mutaciones dentro de una población de células madre de larga vida pueden iniciar la formación de las células madre de cáncer que subyacen en el crecimiento y el mantenimiento de los tumores y cuya presencia contribuye a la insuficiencia de las estrategias terapéuticas actuales.

[0014] La naturaleza de las células madre de cáncer se reveló por primera vez en el cáncer de sangre, leucemia mieloide aguda (AML) (Lapidot et al., 1994, Nature 17:645-8). Más recientemente se ha demostrado que los tumores de mama malignos humanos albergan de manera similar una población pequeña distinta de células madre de cáncer enriquecidas por la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes. Se observó que una población de células ESA+, CD44 +, CD24-/baja, Lin estaba 50 veces enriquecida en células tumorigénicas en comparación con las células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj y col., 2003, PNAS 100:3983-8). La capacidad de aislar las células de cáncer tumorigénicas de forma prospectiva ha permitido la investigación de mecanismos biológicos críticos que subyacen en la tumorigenicidad en estas células, y por lo tanto promete el desarrollo de mejores ensayos de diagnóstico y agentes terapéuticos para pacientes con cáncer. La presente invención se dirige a este objetivo

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0015] La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano en el que la región de unión a no-ligando es las repeticiones 1-10 de EGF y en el que el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan el receptor Notch. El anticuerpo se puede utilizar en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano en el que la región de unión a no-ligando es las repeticiones 1-10 de EGF y en el que el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan el receptor Notch

[0016] En este documento se contemplan varias ventajas en el uso de un anticuerpo que se une a miembros de la familia de receptores Notch o los ligandos a dichos receptores Notch para tratar dicho cáncer. En particular, ciertos receptores Notch son altamente expresados en ciertos tumores sólidos, por ejemplo, de mama y de colon, y esto proporciona un sumidero para fármacos activos donde el fármaco se une al receptor Notch. Se anticipa que los anticuerpos que se unen a receptores Notch sobreexpresados tienen un mejor perfil de seguridad que los fármacos quimioterapéuticos actualmente disponibles.

[0017] Los ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar utilizando una composición terapéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, sarcomas y carcinomas tales como, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma,ependioma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. La presente invención es aplicable a los sarcomas y cánceres epiteliales, tales como cánceres de ovario y cánceres de mama.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

[0018] Figura 1: Mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales anti-NOTCH1 que se unen a dominios de unión no-ligando. Se separaron proteínas de fusión Fc que contienen una serie de delecciones de dominios EGF de NOTCH1 1-5 (A, B) ó 10-15 (C) mediante SDS-PAGE y se transfirieron con anticuerpo monoclonal 13M57 (A, B) o

31M80 (C). A diferencia de los anticuerpos anti-Fc que detectaban proteínas de fusión en todos los carriles, el anticuerpo 13M57 sólo detectó proteínas de fusión que contienen la repetición 4 de EGF incluyendo EGF 1-4 y EGF 1-5, pero no EGF 1-3 (A) y EGF 4-5; pero no EGF 5 solo (B). Del mismo modo, el anticuerpo 31M80 sólo detectó proteínas de fusión que contienen repetición 13 de EGF (C).

5 [0019] Figura 2: La unión del anticuerpo monoclonal anti-NOTCH1 13M57 y 31M80 a NOTCH1 expresado en la superficie celular. (A) Análisis FACS de células que coexpresan el receptor NOTCH1 de longitud completa y GFP se incubados con, de izquierda a derecha, anticuerpos de control IgG1, 13M57 y antisuero anti-EGF 1-5 de NOTCH1 humano. (B) Análisis de FAC de células transfectadas de manera simulada o células que expresan el receptor NOTCH1 de longitud completa incubadas con anticuerpo anti-receptor NOTCH1 31M80 demuestra que 31M80 reconoce específicamente el receptor NOTCH1. La unión del anticuerpo en relación a un anticuerpo de control IgG se inhibe mediante cantidades crecientes de proteína antígeno que contiene las repeticiones 10-16 de EGF unidas a Fc humano (0,5 x, 3x, y 10x Ag31), pero no la proteína antígeno que contiene las repeticiones 1-5 de EGF unidas a Fc (0,5x, 3x y 10x Ag13). (C) Los anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 y 31M80 mostraron un aumento de la unión a células de tumor de mama PE13 en comparación con un anticuerpo control de isotipo (parte inferior) y esta unión correspondía a células que expresan altos niveles de CD44 y la ESA (parte superior: CD44-eje x y NOTCH1 eje y). Las células aisladas para un estudio de tumorigenicidad se indican en los resultados de la citometría de flujo para el anticuerpo 31M80. (D) Los anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 y 31M80 mostraron un aumento en la unión a las células de tumor de mama T3 en comparación con un anticuerpo control de isotipo (parte inferior) y esta unión correspondía a las células que expresan altos niveles de CD44 y la ESA (parte superior: CD44 eje x y NOTCH1 eje y). (E) El anticuerpo anti-NOTCH1 31M80 mostró un aumento en la unión a células de tumor de colon disociadas de dos pacientes diferentes en comparación con un anticuerpo de control de isotipo.

25 [0020] Figura 3: Anticuerpos contra la incapacidad de EGF13 y EGF4 de NOTCH1 de bloquear de manera eficaz la unión al ligando. Se incubaron células HEK 293 que expresaban NOTCH1 con DLL4-Fc (izquierda) o JAG1-Fc (a la derecha) en presencia de anticuerpos anti-NOTCH1 (13M57, 31M103, 31M106, o 31M108) o los anticuerpos de control anti-DLL4 (21M18) o anti-JAG1 (64M14). La unión de proteínas de fusión Fc a células que expresan NOTCH1 se detectó mediante un anticuerpo de cabra anti-Fc conjugado con PE y citometría de flujo. La inhibición de la unión a ligando por los anticuerpos anti-NOTCH1 se expresó como un porcentaje de inhibición por los anticuerpos de ligando de control. Los anticuerpos anti-NOTCH1 31M103, 31M106, y 31M108, los cuales se unen específicamente a EGF13, inhiben sólo parcialmente la unión a ligando. 31M108 mostró entre 50-75% de inhibición en comparación con los anticuerpos de ligando. De manera similar, 31M103 y 31M106 mostraron sólo entre el 25-50% de inhibición. En cambio, 13M57 no mostró ninguna inhibición de la unión a ligando cuando se comparó con la inhibición por anticuerpos anti-DLL4 o anti-JAG1.

35 [0021] Figura 4: Efecto de anticuerpos monoclonales de NOTCH1 contra EGF4 en el crecimiento in vitro de células tumorales de mama. Se cultivaron células tumorales de mama en presencia de 2,5 ug/ml o 5 ug/ml de anticuerpo anti-NOTCH1, IgG murina de control o sin anticuerpo durante tres días, seguido de 18 horas de marcaje con BrdU. Como se muestra en los gráficos superiores, las células tumorales de mama cultivadas en presencia de anticuerpo anti-NOTCH1 13M7 mostraron una disminución de la relación de absorbancia 450nm/690nm en comparación con los controles. Como un porcentaje de control sin anticuerpo, la presencia de anticuerpos anti-NOTCH1 dio lugar a una disminución estadísticamente significativa por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey en la proliferación de células tumorales de mama en comparación con control sin anticuerpo ($p < 0,05$) o IgG de control ($p < 0,05$) (abajo).

45 [0022] Figura 5: Efecto de anticuerpo monoclonal de NOTCH1 13M57 en células tumorales PE-13 in vivo. Se trataron ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales PE-13 con PBS o anticuerpos anti-NOTCH1 3 días después de la inyección celular, y se determinó el crecimiento de las células tumorales dos veces por semana. El volumen total del tumor se redujo significativamente en un 49% ($p < 0,05$) en los animales tratados con anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 en comparación con los controles inyectados con PBS.

55 [0023] Figura 6: Efecto de los anticuerpos monoclonales de NOTCH1 en células tumorales de colon in vivo. Se trataron ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales de colon OMP-C9 (A) u OMP-C8 (B) con PBS o anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 (A) o 13M57, 31M106, y 31M103 (B) tres días después de la inyección celular y se determinó el crecimiento de células tumorales dos veces por semana. El volumen total del tumor se redujo significativamente en animales tratados con anticuerpos anti-NOTCH1 en comparación con los controles inyectados con PBS en ambos modelos de tumores. Los anticuerpos contra EGF4 y EGF13 eran igualmente eficaces contra los tumores de colon C8 (B).

60 [0024] Figura 7: Efecto de anticuerpos monoclonales de NOTCH1 13M57 en células tumorales PE-13 que expresan luciferasa. Se trataron ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales PE-13 con anticuerpos anti-NOTCH1, anticuerpos de control 5M108 o PBS. Se proporciona una escala de actividad de la luciferasa a la derecha de cada imagen, indicando la parte superior oscura la actividad más alta (100 o superior $\times 10^6$) y niveles más bajos ($< 30 \times 10^6$) que indican una señal baja de luciferasa. (A) Los animales tratados con PBS o anticuerpos de control 5M108 tienen tumores detectados en la región superior oscura de la escala. En cambio, los tumores en los animales tratados con anticuerpos anti-Notch muestran actividad de luciferasa principalmente en la región inferior de la escala.

(B) La cuantificación de la señal de luciferasa muestra que el volumen total del tumor se redujo significativamente ($p = 0,04$) en los animales tratados con anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 en comparación con PBS y los controles inyectados 5M108.

5 [0025] Figura 8: Efecto de anticuerpos monoclonales de NOTCH2 59M07 en el crecimiento del tumor de colon. Se trataron ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de colon C6 con anticuerpos anti-NOTCH2 o vehículo de PBS como control. Los animales tratados con anti-NOTCH2 59M07 (triángulos) mostraron una reducción significativa en el crecimiento del tumor de más de 48 días en comparación con los animales tratados con control (diamantes).

10 [0026] Figura 9: Efecto de anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 y terapia de combinación con quimioterapia en la recurrencia del tumor de mama. (A) Gráfico de la respuesta de tumores UM-PE13 a cuatro regímenes diferentes de tratamiento: Grupo 1: paclitaxel seguido de PBS (cuadrados); Grupo 2: paclitaxel seguido de 13M57 (triángulos invertidos); Grupo 3 paclitaxel + 13M57 seguido de PBS (círculos), y Grupo 4: paclitaxel + 13M57 seguido de 13M57 (diamantes). Los tratamientos iniciales comenzaron cuando el volumen tumoral promedio por grupo ($n = 10$) fue de 130 mm^3 (Flecha: Inicio Paclitaxel). Los tratamientos con paclitaxel (o Paclitaxel + 13M57) se detuvieron en el día 52 después de que los tumores habían experimentado una regresión y eran indetectables (Flecha: detención Paclitaxel). (B) Se representan tanto los volúmenes de tumores individuales de animales (puntos) como los volúmenes tumorales promedio (líneas) para cada grupo de tratamiento. El tratamiento de combinación concurrente seguido de un tratamiento continuo con anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 (a la derecha) tuvo el mayor efecto sobre la inhibición de la recurrencia del tumor después de la interrupción del tratamiento con paclitaxel.

20 [0027] Figura 10: Efecto de anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 y terapia de combinación con quimioterapia en el crecimiento del tumor de colon. (A) Gráfico del volumen del tumor de colon C8 durante y después del tratamiento dos veces por semana con $7,5 \text{ mg/kg}$ de irinotecán, o con 10 mg/kg del anticuerpo anti-NOTCH1 13M57 más $7,5 \text{ mg/kg}$ de irinotecán ($n = 10$). El volumen del tumor de diez animales se evaluó dos veces por semana. La última dosis de tratamiento se administró en el día 56 (*). (B) Gráfico del volumen del tumor de colon C8 durante y después del tratamiento dos veces por semana con $7,5 \text{ mg/kg}$ de irinotecán más 10 mg/kg de 13M57. El volumen del tumor de diez animales se evaluó dos veces por semana. La última dosis de tratamiento se administró en el día 56 (*). El tratamiento de combinación simultánea de irinotecán y 13M57 prevenía el crecimiento del tumor de colon y también mantenía las células tumorales en este estado no proliferativo de hasta treinta días posteriores al tratamiento.

25 [0028] Figura 11: Efecto de anticuerpos anti-NOTCH1 13M57 y terapia de combinación con quimioterapia en el crecimiento de tumores de colon establecidos. El gráfico muestra el volumen de tumor de colon C8 en el transcurso del tratamiento con oxaliplatino (triángulos), 10 mg/kg de 13M57 (diamantes), una combinación de oxaliplatino y 13M57 (círculos), o un anticuerpo de control (cuadrados). El tratamiento con anti-NOTCH1 13M57 o oxaliplatino redujo significativamente el crecimiento del tumor ($p = 0,04$ frente a control), pero el tratamiento de combinación redujo aún más el crecimiento en comparación con el tratamiento con cualquier agente solo ($p = 0,03$ vs agente único).

30 [0029] Figura 12: Efecto de la terapia de combinación de anticuerpos de NOTCH1 y NOTCH2 en el crecimiento de tumores de mama. (A) Gráfico de formación de imágenes por bioluminiscencia de los animales tratados con 10 mg/kg de anti-NOTCH1 31M108 (triángulos blancos), 10 mg/kg de anti-59M07 NOTCH2 (triángulos rellenos), una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y NOTCH2 (triángulos invertidos rellenos), o un anticuerpo de control (círculos blancos). Los animales fueron analizados por la imagen dos veces por semana. El tratamiento de combinación con anticuerpos anti-NOTCH1 y NOTCH2 redujo significativamente el crecimiento de células tumorales PE13 que expresan la luciferasa. (B) Gráfico del volumen total del tumor de los animales tratados con 10 mg/kg de anti-NOTCH1 31M108 (triángulos blancos), 10 mg/kg de anti-NOTCH2 59M07 (triángulos rellenos), una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y NOTCH2 (triángulos invertidos rellenos), o un anticuerpo de control (círculos blancos). El volumen del tumor se evaluó dos veces por semana. Los animales tratados con anticuerpos 31M108 mostraron una reducción significativa en el volumen total del tumor en comparación con los animales tratados con control ($p < 0,05$). Se observó una reducción adicional del crecimiento del tumor de mama en animales tratados con una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y anti-NOTCH2 en comparación con el tratamiento con anticuerpo solo ($p < 0,05$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

60 [0030] El término "antagonista" incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza, parcial o totalmente, una actividad biológica del mecanismo de Notch. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos antagonistas, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de los receptores Notch nativos. El término "antagonista" se usa aquí para incluir cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza, parcial o totalmente, la expresión o la actividad biológica de un marcador de células madre de cáncer descrito en este documento y dicha actividad biológica incluye, pero sin limitación, la inhibición del crecimiento del tumor.

[0031] El término "anticuerpo" se usa para significar una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores, etc, a través de por lo menos un sitio de reconocimiento de antígenos dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en este documento, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), mutantes de Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), en base a la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada referidas como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferentes y conocidas estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser desnudos o estar conjugados a otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc

[0032] Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables de determinación antigénica de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena única, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0033] Un "anticuerpo Fv" se refiere al fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno ya sea como dos cadenas, en que un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera forman un dímero no covalente, o como una sola cadena (scFv), en que un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera están unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de modo que las dos cadenas se asocian en una estructura dimerica similar. En esta configuración las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir la especificidad de unión al antígeno del dímero Fv. Alternativamente, un único dominio variable (o la mitad de un Fv) se puede utilizar para reconocer y unirse al antígeno, aunque generalmente con menor afinidad.

[0034] Un "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza aquí, se refiere a la población homogénea de anticuerpos involucrada en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epitopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca tanto los anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), los mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos producidos de cualquier manera que incluye, pero sin limitación, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos

[0035] Tal como se usa en este documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen un mínimo de secuencias no humanas. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) se sustituyen por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de Fv de una inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no-humana que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente mediante la sustitución de un residuo adicional, ya sea en la región estructural de Fv y/o en los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad, y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente de EE.UU. 5.225.539.

[0036] El término "anticuerpo humano", tal como se usa en este documento, significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un ser humano fabricado usando cualquiera de las técnicas conocidas en el sector. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden por lo menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y polipéptidos de cadena pesada humana.

[0037] "Anticuerpos híbridos" son moléculas de inmunoglobulina en que parejas de cadenas pesada y ligera de anticuerpos con diferentes regiones determinantes antigénicas se ensamblan, de manera que se pueden reconocer dos epítosos diferentes o dos antígenos diferentes y unirse por el tetrámero resultante.

5 [0038] El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina deriva de dos o más especies. Habitualmente, la región variable de las cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro (normalmente humano) para evitar la obtención
10 de una respuesta inmune en esa especie.

[0039] El término "epítipo" o "determinante antigénico" se utilizan indistintamente aquí y se refieren a aquella parte de un antígeno capaz de ser reconocido y unirse específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítosos pueden estar formados de aminoácidos contiguos y no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítosos formados a partir de aminoácidos contiguos se mantienen habitualmente tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítosos formados por el plegamiento terciario habitualmente se pierden tras la desnaturalización de la proteína. Un epítipo incluye habitualmente por lo menos 3, y más normalmente, por lo menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial.
15

[0040] La competencia entre los anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición de sándwich (véase Stahl
20 et al, Methods in Enzymology 9:242-253 (1983).); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (véase Kirkland et al, J. Immunol 137:3614-3619 (1986)); ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayo sándwich de marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcado directo en fase sólida usando un marcador de I-125 (véase Morel et al, Molec Immunol 25 (1):7-15 (1988)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Cheung et al, Virology 176:546-552 (1990)); y RIA de marcado directo (Moldenhauer et al, Scand J. Immunol. 32:77-82 (1990)). Habitualmente, dicho ensayo implica el uso de antígeno
25 purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de ellos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de prueba o ensayo. Por lo general, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca un impedimento estérico. Por lo general, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en por lo menos un 50 ó 75%.
30

[0041] Que un anticuerpo "se une selectivamente" o "se une específicamente" a un epítipo o receptor significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de las anteriores al epítipo o receptor que con sustancias alternativas, incluyendo las proteínas no relacionadas. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una KD de por lo menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente
35 por lo menos aproximadamente 1 uM. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa a veces que un anticuerpo se une a una proteína, a veces con una KD de por lo menos aproximadamente 0,1 uM o mejor, y en otras ocasiones por lo menos aproximadamente 0,01 uM o mejor. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas de diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce un marcador de células madre de cáncer en más de una especie.
40

[0042] Tal como se usa en este documento, los términos "unión no específica" y "la unión de base" cuando se utilizan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido se refieren a una interacción que no es dependiente de la presencia de una estructura particular (es decir, el anticuerpo se une a las proteínas en general, en lugar de una estructura particular, tal como un epítipo).
45

[0043] Los términos "aislado" o "purificado" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación se purifican sustancialmente. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean de forma natural el gen y codifican proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado se separa de otras proteínas no inmunoglobulinas y de otras proteínas de inmunoglobulina con diferente especificidad de unión al antígeno. También puede significar que el ácido nucleico o la proteína es por lo menos menos 85% pura, por lo menos 95% pura, y en algunas realizaciones, por lo menos 99% pura.
50
55
60
65

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refiere o describen la condición fisiológica en mamíferos en que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cáncer incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma de célula escamosa del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0045] Los términos "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refieren a trastornos asociados con la proliferación anormal de células, tal como el cáncer.

[0046] "Tumor" y "neoplasma", tal como se utilizan aquí, se refieren a cualquier masa de tejido que resulte del crecimiento o proliferación celular excesivo, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso), incluyendo lesiones precancerosas.

[0047] "Metástasis", tal como se utiliza aquí, se refiere al proceso por el cual un cáncer se extiende o transfiere desde el sitio del origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva localización. Una célula "metastásica" o "metastizante" es aquella que pierde los contactos adhesivos con las células vecinas y migra a través del torrente sanguíneo o linfa desde el sitio primario de la enfermedad para invadir estructuras vecinas del cuerpo.

[0048] Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, pero sin limitación, humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que sea el receptor de un tratamiento particular. Habitualmente, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente aquí en referencia a un sujeto humano.

[0049] Los términos "célula madre de cáncer", "célula madre de tumor", o "célula madre de tumor sólido" se utilizan indistintamente aquí y se refiere a una población de células de un tumor sólido que: (1) tenga una extensa capacidad proliferativa; 2) sea capaz de la división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie diferenciada con potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) sea capaz de divisiones celulares simétricas para la autorenovación o automantenimiento. Estas propiedades de "células madre de cáncer", "células madre de tumor" o "células madre de tumores sólidos" confieren a estas células madre de cáncer la capacidad de formar tumores palpables tras el trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido comparado con la mayoría de células tumorales que no consiguen formar tumores. Las células madre del cáncer se someten a la auto-renovación frente a la diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar con el tiempo a medida que ocurren las mutaciones. Las células madre de tumores sólidos de la presente invención difieren de los la "línea madre de cáncer", proporcionadas por la patente de EE.UU. N ° 6.004.528. En esa patente, la "línea madre del cáncer" se define como un tipo de célula progenitora que crece lentamente que en sí misma tiene pocas mutaciones, pero que se somete a divisiones celulares simétricas en lugar de asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que tienen lugar en el entorno de la célula. Esta hipótesis de "línea madre del cáncer" propone de este modo que aparecen ampliamente células tumorales rápidamente proliferantes como resultado de un entorno anormal, lo cual hace que las células madre relativamente normales se acumulen y a continuación experimenten mutaciones que causan que se conviertan en células tumorales. La patente de EE.UU. N ° 6.004.528 propone que dicho modelo se puede utilizar para mejorar el diagnóstico de cáncer. El modelo de célula madre de tumor sólido es fundamentalmente diferente del modelo de "línea madre del cáncer" y como resultado muestra utilidades no ofrecidas por el modelo de "línea madre del cáncer". En primer lugar, las células madre de tumores sólidos no se "reponen de forma mutacional". La "línea madre del cáncer repuesta de forma mutacional" descrita por la patente de EE.UU. n° 6.004.528 se puede considerar una lesión pre-cancerosa, mientras que las células madre de tumor sólido descritas por esta invención son células cancerosas que contienen ellas mismas las mutaciones que son responsables de la tumorigénesis. Es decir, las células madre de tumores sólidos ("células madre del cáncer") de la invención se incluirían entre las células muy mutadas que se distinguen de la "línea madre del cáncer" en la patente de EE.UU. N° 6.004.528. En segundo lugar, las mutaciones genéticas que conducen al cáncer pueden ser ampliamente intrínsecas dentro de las células madre de tumores sólidos, así como del entorno. El modelo de células madre de tumores sólidos predice que las células madre de tumorales sólidos aisladas pueden dar lugar a tumores adicionales tras el trasplante (lo que explica la metástasis), mientras que el modelo de "línea madre del cáncer" predeciría que "la línea madre de cáncer" trasplantada no serían capaces de dar lugar a un nuevo tumor, ya que era su entorno anormal que era tumorigénico. En efecto, la capacidad de trasplantar células madre de tumores sólidos humanos disociados, y fenotípicamente aislados, en ratones (en un entorno que es muy diferente del entorno normal del tumor), en que todavía forman nuevos tumores, distingue la presente invención del modelo de "línea madre del cáncer". En tercer lugar, las células madre de tumores sólidos probablemente se dividen tanto simétrica como asimétricamente, de manera que la división celular simétrica no es una propiedad obligada. En cuarto lugar, las células madre de tumores sólidos pueden dividirse rápidamente o lentamente, dependiendo de muchas variables, de manera que una velocidad de proliferación lenta no es una característica definidora.

[0050] Los términos "célula cancerosa", "célula tumoral" y los equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor que incluyen células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales y células madre tumorigénicas (células madre de cáncer).

[0051] Tal como se utiliza aquí, "tumorigénico" se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido que incluye las propiedades de autorenovación (que dan lugar a células madre de cáncer tumorigénico) y la proliferación para generar otras células tumorales (que dan lugar a células tumorales diferenciadas y de este modo no tumorigénicas) que permiten que las células madre de tumor sólido formen un tumor.

[0052] Tal como se utiliza aquí, los términos " marcador o marcadores de cáncer de células madre", "marcador o marcadores de células madre de cáncer", "marcador o marcadores de células madre de tumor", o "marcador o marcadores de células madre de tumores sólidos" se refieren a un gen o genes o una proteína, polipéptido, o péptido expresado por el gen o genes cuyo nivel de expresión, solos o en combinación con otros genes, se correlaciona con la presencia de células cancerosas tumorigénicas en comparación con células no tumorigénicas. La correlación se puede relacionar con una expresión incrementada o disminuida del gen (por ejemplo, niveles incrementados o disminuidos de ARNm o el péptido codificado por el gen).

[0053] Los términos "firma de genes de células madre de cáncer", "firma de genes de células madre del tumor" o "firma de células madre de cáncer" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a firmas de genes que comprenden los genes expresados diferencialmente en células madre de cáncer en comparación con otras células o población de células, por ejemplo, tejido epitelial mamario normal. En algunas realizaciones, las firmas de genes de células madre de cáncer comprenden genes expresados diferencialmente en células madre de cáncer frente a epitelio de mama normal en un factor de cambio, por ejemplo, en una expresión reducida y/o elevada de dos veces, y además limitado por el uso de un análisis estadístico tal como, por ejemplo, el valor de P de un test t a través de múltiples muestras. En otra realización, los genes expresados diferencialmente en células madre de cáncer se dividen en firmas de genes de células madre de cáncer basadas en la correlación de su expresión con un gen elegido en combinación con su factor de cambio o porcentaje de expresión. Las firmas de células madre de cáncer son predictivas tanto de manera retrospectiva como prospectiva de un aspecto de la variabilidad clínica, incluyendo, pero sin limitación, la metástasis y la muerte.

[0054] El término "prueba genética", tal como se usa aquí, se refiere a los procedimientos en los que se analiza la composición genética de un paciente o una muestra de tumor del paciente. El análisis puede incluir la detección de ADN, ARN, cromosomas, proteínas o metabolitos para detectar genotipos o cariotipos relacionados con enfermedades hereditarias o somáticas para fines clínicos.

[0055] Tal como se usa en este documento, los términos "biopsia" o "tejido de la biopsia" se refieren a una muestra de tejido o fluido que se extrae de un sujeto con el propósito de determinar si la muestra contiene tejido canceroso. En algunas realizaciones, se obtiene un tejido o fluido de biopsia debido a que un sujeto se sospecha que tiene cáncer. El tejido o líquido de la biopsia se examina a continuación por la presencia o ausencia de cáncer.

[0056] Tal como se usa en este documento un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier material que, cuando se combina con un principio activo de una composición farmacéutica, tal como un anticuerpo, permite al anticuerpo, por ejemplo, conservar su actividad biológica. Además, un "portador farmacéuticamente aceptable" no desencadena una respuesta inmune en un sujeto receptor. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, y diversas emulsiones de aceite/agua. Algunos diluyentes para la administración por aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9%).

[0057] El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir y detener la metástasis del tumor; inhibir y detener el crecimiento tumoral; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer, o una combinación de dichos efectos en las células cancerosas. Siempre que el fármaco evite el crecimiento y/o elimine las células cancerosas existentes, puede referirse como citostático y / o citotóxico.

[0058] Tal como se usa en este documento, "proporcionar un diagnóstico" o "información de diagnóstico" se refiere a cualquier información que es útil para determinar si un paciente tiene una enfermedad o afección y/o en la clasificación de la enfermedad o afección en una categoría fenotípica o cualquier categoría que tiene importancia con respecto al pronóstico de respuesta o la probabilidad de respuesta al tratamiento (ya sea un tratamiento en general o cualquier tratamiento en particular) de la enfermedad o afección. De forma similar, el diagnóstico se refiere a proporcionar cualquier tipo de información de diagnóstico, incluyendo, pero sin limitación, si es probable que un sujeto tenga una afección (tal como, un tumor), la información relacionada con la naturaleza o la clasificación de un tumor como por ejemplo un tumor de alto riesgo o un tumor de bajo riesgo, la información relacionada con el

pronóstico y/o información útil en la selección de un tratamiento adecuado. La selección del tratamiento puede incluir la elección de un agente quimioterapéutico particular u otra modalidad de tratamiento, tal como la cirugía o la radiación o una elección sobre si se debe mantener o liberar la terapia.

5 [0059] Tal como se usa en este documento, los términos "proporcionar un pronóstico", "información de pronóstico", o "información predictiva" se refieren a proporcionar información sobre el impacto de la presencia de cáncer (por ejemplo, tal como se determina por métodos de diagnóstico de la presente invención) en la salud futura del sujeto (por ejemplo, la morbilidad o la mortalidad esperada, la probabilidad de contraer cáncer, y el riesgo de metástasis).

10 [0060] Los términos, tales como "tratar" o "tratamiento" o "para tratar" o "aliviar" o "alivio" se refieren tanto a 1) las medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado, como a 2) las medidas profilácticas o preventivas que evitan o retardan el desarrollo de una afección o trastorno patológico reconocido. De este modo, aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno, y aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. Un sujeto es "tratado" con éxito de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente presenta uno o más de los siguientes: una reducción en el número de células cancerosas o la ausencia completa de las mismas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de la infiltración de células cancerosas o ausencia de la misma en órganos periféricos incluyendo la extensión del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición de metástasis tumoral o ausencia de la misma; inhibición de crecimiento del tumor o ausencia del mismo; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad y mejora la calidad de vida.

25 [0061] Tal como se usa en este documento, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o variantes estructurales relacionadas) unidas a través de enlaces fosfodiéster, incluyendo, pero sin limitación, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN incluyendo, pero sin limitación, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N⁶-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil 2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 30 N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil 2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2 tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

35 [0062] El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende la secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede ser codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante, siempre y cuando se mantengan la actividad o propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligandos, transducción de señales, inmunogenicidad, etc) de la longitud completa o un fragmento. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias situadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo de tal manera que el gen se corresponde con la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan como secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en 3' o en dirección 3' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto las formas de ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida por secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias." Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en el ARN nuclear (ARNm); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "se empalman" a partir del transcrito nuclear o primario; por lo tanto, los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente. Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también puede incluir secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se encuentran 5' o 55 3' de las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras, tales como promotores y potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión después de la transcripción y la poliadenilación.

60 [0063] El término "recombinante" cuando se usa con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos, la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos, o que la célula deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se sobreexpresan o en cualquier caso se expresan de manera anormal, tal como, por ejemplo, se expresan como fragmentos no naturales o variantes de

65

empalme. Por el término "ácido nucleico recombinante" en este documento se entiende ácido nucleico, formado originalmente in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. De esta manera, se consigue la unión operativa de diferentes secuencias. De este modo, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro mediante la unión de moléculas de ADN que no están normalmente unidas, se consideran recombinantes para los fines de la presente invención. Se entiende que una vez producido un ácido nucleico recombinante e introducido en una célula u organismo huésped, se replicará de forma no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped en lugar de manipulaciones in vitro; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente replicados de forma no recombinante, aún se consideran recombinantes para los propósitos de la invención. Del mismo modo, una "proteína recombinante" es una proteína producida usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se ha indicado anteriormente.

[0064] Tal como se utiliza aquí, el término "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducido en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo para un organismo que ha sido alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, añadido en múltiples copias, ligado a secuencias reguladoras no nativas, etc). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias de genes heterólogos están habitualmente unidas a secuencias de ADN que no se encuentran de forma natural asociadas con las secuencias de genes en el cromosoma o están asociadas con las partes del cromosoma que no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, los genes expresados en locus donde el gen no se expresa normalmente).

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren un segmento o segmentos de ADN de una célula a otra. El término "vehículo" se utiliza a veces indistintamente con "vector". Los vectores a menudo derivan de plásmidos, bacteriófagos o virus de plantas o animales.

[0066] "Ligación" o "unión" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena. A menos que se disponga lo contrario, la ligación puede realizarse usando tampones y condiciones conocidas con 10 unidades de ligasa de ADN T4 ("ligasa") por 0,5 ug de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a unir. La ligación de ácido nucleico puede servir para unir dos proteínas juntas en marco para producir una única proteína, o proteína de fusión.

[0067] Como se usa en este documento, el término "expresión génica" se refiere al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) a través de la "transcripción" del gen (por ejemplo, a través de la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para los genes de codificación de proteínas, en proteínas a través de la "traducción" de ARNm. La expresión génica puede regularse en muchas etapas en el proceso. La "sobreregulación" o "activación" se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (por ejemplo, ARN o proteína), mientras que "regulación a la baja" o "represión" se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la sobreregulación o regulación a la baja a menudo se llaman "activadores" y "represores", respectivamente.

[0068] Los términos "polipéptido", "péptido", "proteína" y "fragmento de proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

[0069] El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido de origen natural.

[0070] "Variantes modificadas de manera conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. "Variantes de aminoácidos" se refiere a secuencias de aminoácidos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas (por ejemplo, contigua

de forma natural). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. De este modo, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado por otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Se sabe que en ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica una polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sondas reales. En cuanto a las secuencias de aminoácidos, se entenderá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" incluyendo cuando la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidos en la técnica. Dichas variantes modificadas de manera conservativa son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de la invención. Las sustituciones conservativas habituales incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T), y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

[0071] El término "epítipo etiquetado" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende una proteína marcadora de células madre de cáncer, o una secuencia de dominio o parte de la misma, fusionada a un "epítipo etiqueta". El polipéptido epítipo etiqueta comprende suficientes residuos de aminoácidos para proporcionar un epítipo para el reconocimiento por un anticurpo, aunque es demasiado corto de manera que no interfiera con la actividad de la proteína marcadora de células madre de cáncer. Los epítipos etiqueta adecuados tienen en general por lo menos seis residuos de aminoácidos, normalmente entre aproximadamente 8 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, y a veces, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos. Los epítipos etiqueta utilizados habitualmente incluyen etiquetas Fc, HA, His, y FLAG.

Ciertas realizaciones de la presente invención

[0072] La presente invención proporciona composiciones para estudiar, diagnosticar, caracterizar y tratar el cáncer.

[0073] La presente invención identifica anticuerpos que se unen específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhiben el crecimiento tumoral in vivo. La región de unión a ligando de Notch, que es necesaria y suficiente para la unión a ligando, se ha identificado como las repeticiones 11 y 12 de EGF, lo que sugiere que esta región del receptor Notch es importante en la señalización de Notch y la tumorigénesis (Rebay et al., 1991, Cell 67:687; Lei et al., 2003, Dev. 130:6411; Hambleton et al., 2004, Structure 12:2173). Rebay et al., Cell vol. 67, no.4, 15 Noviembre 1991, páginas 687-699, describe el papel de las repeticiones de EGF específicas de Notch en la mediación de interacciones con Delta y serrate. Posteriormente, se desarrollaron como agentes antineoplásicos anticuerpos dirigidos a reconocer y bloquear estos sitios de interacción (EGF11 y EGF12) (WO2005/054434; WO00/20576). Inesperadamente y por primera vez, se observó que los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión a ligando del dominio extracelular del receptor Notch humano inhibía el crecimiento de células tumorales in vivo. Uno de dichos anticuerpos para un epítipo en la repetición 4 de EGF de NOTCH1 inhibía el crecimiento de células tumorales en un modelo animal. Estos resultados sugieren que los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión a ligando del dominio extracelular de uno o más receptores Notch humanos, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4, tienen valor como potenciales agentes terapéuticos del cáncer.

[0074] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales tal como se define en la reivindicación 1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une a una región de unión a no ligando del dominio extracelular del receptor NOTCH1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de por lo menos dos miembros de la familia de receptores Notch.

[0075] En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales es un anticuerpo quimérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no

ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales es un anticuerpo humanizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales es un anticuerpo humano. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un hibridoma que produce el anticuerpo, tal como se establece en la reivindicación adjunta 10.

[0076] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando que comprende las repeticiones 1-10 de EGF del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan el receptor Notch. Ciertas realizaciones proporcionan un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando que comprende las repeticiones 4 d EGF del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales.

[0077] En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención comprende: (a) una región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de CDR establecidas en las SEQ ID NOS: 12, 13, y 14; y (b) una región avriable de cadena ligera que tiene las secuencias de CDR establecidas en las SEQ ID NOS: 15, 16, y 17. El anticuerpo puede comprender: (a) cadenas pesadas establecidas en las SEQ ID NOS: 4 y 5; y (b) cadenas ligeras establecidas en las SEQ ID NOS: 6 y 7.

[0078] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo para utilizar en un método de tratamiento del cáncer, tal como se define en las reivindicación 10. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento de cáncer en un sujeto con necesidad del mismo comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo al sujeto que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular del receptor NOTCH1 e inhibe el crecimiento de células tumorales . En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a al menos dos miembros de la familia de receptores Notch e inhibe el crecimiento de células tumorales.

[0079] En ciertas realizaciones, el método de tratamiento de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal que une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo quimérico que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratar el cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humano que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales.

[0080] En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano, que comprende repeticiones 4 de EGF e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano que comprende repeticiones 4 de EGF e inhibe el crecimiento de células tumorales.

[0081] En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido aislado que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano, que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NOS: 12, 13, y 14; y (b) una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NOS: 15, 16, y 17 e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano, que comprende (a) cadenas pesadas expuestas en las SEQ ID NOS: 4 y 5, y (b) cadenas ligeras expuestas en las SEQ ID NOS: 6 y 7.

[0082] En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado a un grupo citotóxico que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales en combinación con la terapia de radiación. En ciertas realizaciones el método de tratamiento de cáncer comprende administrar una

cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales en combinación con quimioterapia. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales que son de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor pancreático, tumor de próstata, o un tumor de cabeza y cuello.

[0083] En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende identificar pacientes utilizando una prueba genética para el tratamiento con el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento del cáncer comprende identificar los pacientes para el tratamiento con el anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano usando una prueba genética que detecta una firma de células madre de cáncer, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de las células tumorales.

[0084] También se describe aquí un método de identificación de una molécula que se une a una región de unión a no ligando de un dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales, comprendiendo el método: i) incubar la molécula con el dominio de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano, ii) determinar si la molécula se une a la región de unión a no ligando del dominio extracelular del receptor Notch humano, y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento de células tumorales. Un método de identificación de una molécula que se une a una región de unión a no ligando de un dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales puede comprender i) incubar la molécula con el dominio de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende las repeticiones 1-10 de EGF, ii) determinar si la molécula se une a la región de unión a no ligando del dominio extracelular del receptor Notch humano que comprende las repeticiones 1-10 de EGF, y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento de células tumorales. Un método de identificación de una molécula que se une a una región de unión a no ligando de un dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de células tumorales puede comprender: i) incubar la molécula con el dominio de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano que comprende las repeticiones 13-36 de EGF; ii) determinar si la molécula se une a la región de unión a no ligando del dominio extracelular del receptor Notch humano que comprende las repeticiones 13-36 de EGF, y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento de células tumorales.

[0085] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo tal como se establece en la reivindicación 20 adjunta.

Células madre y células madre de tumores sólidos

[0086] Los cánceres habituales aparecen en tejidos que contienen una subpoblación de células proliferativas que son sensibles a la reposición de las células maduras de vida corta. En dichos órganos, la maduración celular se dispone en una jerarquía en que una población rara de células madre da lugar a células más diferenciadas y se perpetúan ellas mismas a través de un proceso denominado de autorenovación (Akashi & Weissman, *Developmental Biology of Hematopoiesis*, Oxford Univ. Press, NY, 2001; Spangrude et al., 1988, *Science* 241:58-61; Baum et al., 1992, *PNAS* 89:2804-8; Morrison et al., 1995, *PNAS* 92: 10302-6; Morrison et al., 1996, *Immunity* 5:207-16; Morrison et al., 1995, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:35-71; Morrison et al., 1997, *Dev.* 124:1929-39; Morrison & Weissman, 1994, *Immunity* 1:661; Morrison et al., 1997, *Cell* 88:287-98; Uchida et al., 2000, *PNAS* 97:14720-5; Morrison et al., 2000, *Cell* 101:499-510). Aunque es probable que la mayoría de tejidos contengan células madre, debido a su rareza, estas células se han identificado y purificado rigurosamente para estudiar sus propiedades biológicas, moleculares y bioquímicas en sólo unos tejidos. Las células madre mejor caracterizadas son aquellas que dan lugar al sistema hematopoyético, denominado células madre hematopoyéticas (HSCs). La utilidad de las HSC ha quedado demostrada en la terapia contra el cáncer con su amplio uso en el trasplante de médula ósea para regenerar el sistema hematolinfático siguiendo los protocolos mieloablativos (Baum et al., *Bone Marrow Transplantation*, Blackwell Scientific Publications, Boston, 1994). El entendimiento de la biología celular de los tejidos en que aparecen los cánceres, y específicamente de las células madre que residen en estos tejidos, promete proporcionar nuevos conocimientos en la biología del cáncer.

[0087] Como los tejidos en los que se originan, los tumores sólidos consisten en una población heterogénea de células. Que la mayoría de estas células carecían de tumorigenicidad sugería que el desarrollo y mantenimiento de tumores sólidos también depende de una pequeña población de células madre (es decir, células cancerosas tumorigénicas) con la capacidad de proliferar y dar lugar de manera eficaz a células madre de tumor adicionales (autorenovación) y a la mayoría de células de tumor más diferenciadas que carecen de potencial tumorigénico (es decir, células cancerosas no tumorigénicas). El concepto de células madre de cáncer se introdujo por primera vez

poco después del descubrimiento de HSC y se estableció experimentalmente en leucemia mielógena aguda (AML) (Park et al., 1971, J. Natl. Cancer Inst. 46:411-22; Lapidot et al., 1994, Nature 367:645-8; Bonnet & Dick, 1997, Nat. Med. 3:730-7; Hope et al., 2004, Nat. Immunol. 5:738-43). Las células madre de tumores sólidos se han aislado recientemente en base a su expresión de un patrón único de receptores de la superficie celular y en la valoración de sus propiedades de autorenovación y proliferación en el cultivo y modelos animales de xenoinjerto. Se descubrió una población de linaje bajo de ESA+ CD44+ CD24- enriquecida en más de 50 veces en la capacidad de formar tumores en relación con las células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., 2003, PNAS 100: 3983-8). La capacidad de aislar células madre de cáncer tumorigénicas de la mayoría de células madre tumorales no tumorigénicas ha conducido a la identificación de marcadores de células madre de cáncer, genes con expresión diferencial en células madre de cáncer en comparación con células de tumor no tumorigénicas o epitelio de mama normal, utilizando análisis de microarrays. La presente invención utiliza el conocimiento de estos marcadores de células madre de cáncer identificados para estudiar, caracterizar, diagnosticar y tratar el cáncer.

Proteína marcadora de células madre de cáncer

[0088] Las células madre normales y las células madre de cáncer comparten la capacidad de proliferar y autorenovarse, por tanto no es sorprendente que un conjunto de genes que regulan el desarrollo normal de células madre contribuyan a la tumorigénesis (revisado en Reya et al., 2001, Nature 414:105-111 and Taipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-354). La presente invención identifica el receptor Notch, por ejemplo, Notch1 como marcador de células madre de cáncer, implicando el mecanismo de señalización de Notch en el mantenimiento de células madre de cáncer y como diana para el tratamiento del cáncer a través de la eliminación de estas células tumorigénicas.

[0089] El mecanismo de señalización de Notch es uno de diversos reguladores críticos de formación del patrón embrionario, el mantenimiento del tejido post-embrionario y la biología de células madre. Más específicamente, la señalización de Notch está implicada en el proceso de la inhibición lateral entre destinos celulares adyacentes y juega un papel importante en la determinación del destino celular durante las divisiones celulares asimétricas. La señalización de Notch no regulada está asociada con numerosos cánceres humanos donde pueden alterar el destino del desarrollo de células tumorales para mantenerlas en un estado no diferenciado y proliferativo (Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69). De este modo, la carcinogénesis puede proceder mediante la usurpación de mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y la reparación de tejidos por las poblaciones de células madre (Beachy et al., 2004, Nature 432:324).

[0090] El receptor Notch se identificó por primera vez en mutantes de *Drosophila* con haploinsuficiencia dando lugar a muescas en el margen del ala, a la vez que la pérdida de función produce un fenotipo "neurogénico" letal embrionario donde las células de la epidermis cambian de destino a tejido neural (Moohr, 1919, Genet 4: 252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool 83: 271). El receptor Notch es un receptor transmembrana de paso único que contiene numerosas repeticiones de tipo EGF en tándem del factor de crecimiento epidérmico y repeticiones Notch/LIN-12 ricas en cisteína en un gran dominio extracelular (Wharton et al., 1985, Cell 43:567; Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094; revisado en Artavanis et al., 1999, Science 284:770). Se han identificado cuatro proteínas Notch de mamífero (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4), y las mutaciones en estos receptores dan lugar invariablemente a anomalías en el desarrollo y patologías humanas, incluyendo varios tipos de cáncer tal como se describe en detalle a continuación (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25).

[0091] El receptor Notch se activa mediante ligandos transmembrana de paso único de la familia Delta, Serrated, Lag-2 (DSL). Existen cinco ligandos de Notch conocidos en mamíferos: tipo Delta 1 (DII1), tipo Delta 3 (DII3), tipo Delta 4 (DII4), Jagged 1 y Jagged 2 caracterizados por un dominio DSL y repeticiones tándem de tipo EGF en el dominio extracelular. El dominio extracelular del receptor Notch interactúa con el de sus ligandos, habitualmente en células adyacentes, dando lugar a dos escisiones proteolíticas de Notch, una extracelular mediada por una proteasa ADAM y una en el dominio transmembrana mediada por la gamma secretasa. Esta última escisión genera el dominio intracelular de Notch (NICD), que a continuación entra en el núcleo donde activa la familia de factores de transcripción de CBF1, Suppressor of Hairless [Su(H)], Lag-2 (CSL) como los principales efectores en dirección 3' para aumentar la transcripción de factores de transcripción básicos nucleares de hélice-bucle-hélice de la familia de Hairy y Enhancer de Split [E(sp1)] (Artavanis et al., 1999, Science 284:770; Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). Los mecanismos intracelulares alternativos que implican la proteína citoplasmática Deltex identificada en *Drosophila* también pueden existir en mamíferos (Martinez et al., 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33), y este mecanismo dependiente de Deltex puede actuar para suprimir la expresión de genes diana de Wnt (Brennan et al., 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence et al., 2001, Curr. Biol. 11:375-85).

[0092] Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las células madre mejor entendidas en el cuerpo y la señalización de Notch está implicada en su mantenimiento normal, así como en la transformación leucémica (Kopper & Hajdu, 2004, Pathol. Oncol. Res. 10:69-73). Las HSC son una población rara de células que residen en un nicho estromal en la médula ósea adulta. Estas células se caracterizan por un único perfil de expresión génica, así como la capacidad de dar lugar de forma continua a más células progenitoras diferenciadas para reconstituir el sistema

hematopoyético completo. La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en HSC y células progenitoras establece líneas celulares inmortalizadas que generan células linfoides y mieloides in vitro y ensayos de reconstitución a largo plazo (Varnum-Finney et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), y la presencia de Jagged 1 incrementa el injerto funcionante de poblaciones celulares de médula ósea humana enriquecida en HSC (Karanu et al., 2000, *J. Exp. Med.* 192:1365-72). Más recientemente, se ha demostrado la señalización de Notch en HSC in vivo se ha observado que está implicada en la inhibición de la diferenciación de HSC. Además, la señalización de Notch parece ser necesaria para la autorenovación de HSC mediada por Wnt (Duncan et al., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).

[0093] El mecanismo de señalización de Notch también juega un papel central en el mantenimiento de células madre neurales implicadas tanto en su mantenimiento normal, como en los cánceres de cerebro (Kopper y Hajdu, 2004, *Pathol Oncol Res.* 10:69-73; Purov et al, 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan. et al, 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800). Las células madre neurales dan lugar a todas las células neuronales y gliales en el sistema nervioso de los mamíferos durante el desarrollo, y más recientemente se han identificado en el cerebro adulto (Gage, 2000, *Ciencia* 287:1433-8). Los ratones deficientes en Notch1, los genes diana de Notch Hes1, 3 y 5, y un regulador de la presenilin1 de señalización de Notch (PS1) muestran una disminución del número de células madre neurales embrionarias. Además, las células madre neurales adultas se reducen en los cerebros de los ratones heterocigotos PS1 (Nakamura et al, 2000, *J. Neurosci* 20:283-93; Hitoshi et al, 2002, *Genes Dev.* 16:846-58). La reducción de las células madre neurales parece resultar de su diferenciación prematura en neuronas (Hatakeyama et al., 2004, *Dev.* 131:5539-50) que sugiere que la señalización de Notch regula la diferenciación de células madre neurales y la autorenovación.

[0094] La señalización aberrante de Notch está implicada en un conjunto de cánceres humanos. El gen de NOTCH1 en los seres humanos se identificó por primera vez en un subconjunto de leucemias linfoblásticas agudas de células T como un locus translocado que daba lugar a la activación del mecanismo de Notch (Ellisen et al., 1991, *Cell*, 66:649-61). La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en las células T en modelos de ratón genera de manera similar linfomas de células T sugiriendo un papel causal (Robey et al, 1996, *Cell*, 87:483-92; Pera et al, 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan et al, 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia et al, 2000, *EMBO J.* 19:3337-48). Recientemente, se ha encontrado que las mutaciones, inserciones y deleciones puntuales de NOTCH1 que producen la señalización aberrante de NOTCH1 están presentes de manera frecuente en leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T de niños y adultos (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).

[0095] La inserción frecuente del virus de tumor mamario de ratón en los locus de Notch1 y Notch4 en tumores mamarios y los fragmentos de proteína Notch activada resultates implicaron por primera vez la señalización de Notch en el cáncer de mama (Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Estudios adicionales en ratones transgénicos han confirmado un papel para Notch en la ramificación ductal durante el desarrollo normal de las glándulas mamarias y una forma constitutivamente activa de Notch4 en células epiteliales mamarias inhibe la diferenciación epitelial y da lugar a la tumorigénesis (Jhappan et al., 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan et al., 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith et al., 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano et al., 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele et al., 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Actualmente, la evidencia para un papel para Notch en el cáncer de mama humano se limita a la expresión de receptores Notch en carcinomas de mama y su correlación con el resultado clínico (Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Además, se ha observado la sobreexpresión del mecanismo de Notch en cánceres cervicales (Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8), carcinomas de células renales (Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32), carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4), cánceres de endometrio (Suzuki et al., 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9), y neuroblastomas (van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8) que sugieren un papel potencial para Notch en el desarrollo de un conjunto de neoplasmas. De manera destacada, el mecanismo de Notch puede jugar un papel en el mantenimiento del estado no diferenciado de células neoplásicas mutantes en Apc del colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends in Mol. Med.* 11:496-502).

[0096] El mecanismo de Notch también está implicado en múltiples aspectos del desarrollo vascular que incluye la proliferación, migración, diferenciación del músculo liso, angiogénesis y diferenciación arterio-venosa (Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Por ejemplo, las mutaciones nulas homocigóticas en Notch-1/4 y Jagged-1, así como la pérdida heterocigótica de Dll4, dan lugar a defectos severos, aunque variables, en el desarrollo arterial y la vascularización del saco vitelino. Además, los embriones de ratones Notch-2 hipomórficos y deficientes en Dll1 muestran una hemorragia que probablemente da lugar a un desarrollo escaso de estructuras vasculares (Gale et al., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue et al., 1999, *Hum. Mol. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis et al., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright et al., 2001, *Dev.* 128:491-502). En un humano, las mutaciones en JAGGED1 están asociadas con el síndrome de Alagille, un trastorno en el desarrollo que incluye defectos vasculares, y las mutaciones en NOTCH3 son responsables de una demencia vascular heredada (CADASIL) en que la homeostasis de los vasos es defectuosa (Joutel et al., 1996, *Nature* 383:707-10).

[0097] La identificación de NOTCH1, NOTCH4, DLL1 y DLL4 como los genes expresados en las células madre de cáncer en comparación con el epitelio de mama normal sugiere que dirigirse al mecanismo de Notch puede ayudar a eliminar no sólo la mayoría de las células cancerosas no tumorigénicas, sino también las células tumorigénicas

responsables de la formación y recurrencia de los tumores sólidos. Además, debido al papel prominente de la angiogénesis en la formación y el mantenimiento de tumores, la diana del mecanismo de Notch también puede inhibir eficazmente la angiogénesis, privando de nutrientes un cáncer y contribuyendo a su eliminación.

5 Ensayos de diagnóstico

[0098] En el presente documento se describe un marcador de células madre del cáncer, la expresión del cual puede ser analizada para detectar, caracterizar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad asociada con la expresión de un marcador de células madre de cáncer. La expresión de un marcador de células madre de cáncer se puede determinar mediante la expresión de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, ARNm que codifica el marcador de células madre de cáncer. El polinucleótido puede detectarse y cuantificarse mediante cualquiera de un conjunto de medios bien conocidos en la técnica. El ARNm que codifica un marcador de células madre de cáncer se puede detectar por hibridación in situ de secciones de tejido a partir de, por ejemplo, una biopsia de un paciente. Alternativamente, el ARN se puede aislar de un tejido y detectarse mediante, por ejemplo, transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa o microarrays. Por ejemplo, el ARN total puede extraerse de una muestra de tejido y se pueden utilizar cebadores que específicamente hibridan y amplifican un marcador de células madre de cáncer para detectar la expresión de un polinucleótido de marcador de células madre de cáncer polinucleótido mediante RT-PCR.

[0099] La expresión de un marcador de células madre de cáncer se puede determinar mediante la detección del polipéptido correspondiente. El polipéptido puede detectarse y cuantificarse mediante cualquiera de un conjunto de medios bien conocidos en la técnica. Un polipéptido de marcador de células madre de cáncer se puede detectar usando métodos bioquímicos analíticos tales como, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC). El polipéptido aislado también se puede secuenciar según técnicas estándar. Una proteína marcadora de células madre de cáncer se puede detectar con anticuerpos producidos contra la proteína utilizando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica en secciones de tejido. Alternativamente, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer pueden detectar la expresión utilizando, por ejemplo, ELISA, FACS, transferencia Western, inmunoprecipitación o microarrays de proteínas. Por ejemplo, las células madre de cáncer se pueden aislar de una biopsia de paciente y se puede detectar la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer con anticuerpos marcados con fluorescencia utilizando FACS. En otro método, las células que expresan un marcador de células madre de cáncer se pueden detectar in vivo utilizando anticuerpos marcados en un sistema de formación de imágenes habitual. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con isótopos paramagnéticos se pueden utilizar para obtener imágenes de resonancia magnética (MRI).

[0100] Un ensayo de diagnóstico puede comprender determinar la expresión o no de un marcador de células madre de cáncer en células tumorales utilizando, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación in situ o RT-PCR. Un ensayo de diagnóstico puede comprender determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer utilizando, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa. Un ensayo de diagnóstico puede comprender además determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer en comparación con un tejido de control, tal como, por ejemplo, epitelio normal.

[0101] La detección de un la expresión de un marcador de células madre de cáncer se puede utilizar a continuación para proporcionar un diagnóstico y seleccionar una terapia. El pronóstico se puede basar en cualquier expresión de riesgo conocida que indica un marcador de células madre del cáncer. Además, la detección de un marcador de células madre del cáncer se puede utilizar para seleccionar una terapia apropiada que incluye, por ejemplo, el tratamiento con un antagonista contra el marcador de células madre de cáncer detectado, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de una proteína marcadora de células madre del cáncer, tal como un receptor NOTCH humano seleccionado del grupo que consiste en NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 y NOTCH4.

[0102] El diagnóstico de un paciente puede realizarse mediante la detección de una firma del gen de células madre de cáncer tal como se indica en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/690.003. Se puede examinar un paciente por la presencia de un tumor o adenoma benigno o pólipos que indican una predisposición al cáncer. A continuación, se analiza una biopsia de un paciente por la presencia de una firma del gen de células madre de cáncer. La expresión de una firma del gen de células madre de cáncer se puede determinar mediante la expresión de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, ARNm que codifica la firma del gen de células madre de cáncer. Los polinucleótidos de una firma del gen del cáncer pueden detectarse y cuantificarse mediante cualquiera de un conjunto de medios bien conocidos en la técnica. La expresión de una firma del gen de células madre de cáncer se puede determinar mediante la detección de los polipéptidos correspondientes. Los polipéptidos pueden ser detectados y cuantificados mediante cualquiera de una serie de medios bien conocidos en la técnica.

[0103] La detección de la firma del gen de las células madre de cáncer se puede utilizar para proporcionar un pronóstico y seleccionar un tratamiento. El pronóstico se puede basar en la expresión de cualquier riesgo conocido en el momento reflejado en la firma del gen de las células madre de cáncer. Además, la detección de la firma del gen de células madre del cáncer se puede utilizar para seleccionar una terapia apropiada que incluyen, por ejemplo, el tratamiento con un antagonista contra un marcador detectado de células madre del cáncer, por ejemplo, un

anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de una proteína marcadora de células madre de cáncer, tal como NOTCH1.

[0104] Los pacientes seleccionados por la presencia de adenomas o pólipos de colon se pueden analizar por la pérdida alélica y las mutaciones somáticas a través de una prueba genética. La prueba genética puede cribar por la pérdida o mutaciones en el mecanismo Wnt, incluyendo, por ejemplo, APC, AXIN2 o beta-catenina. La señalización de Notch puede jugar un papel en el mantenimiento del estado no diferenciado de las células neoplásicas activadas por la señalización Wnt no regulada (van Es y Clevers, 2005, Trends in Mol. Med. 11:496-502), por lo tanto, se pueden utilizar antagonistas contra el marcador de células madre de cáncer NOTCH1 como un tratamiento para cánceres de colon activados por Wnt. El antagonista puede ser un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de NOTCH1.

Antagonistas marcadores de células madre del cáncer

[0105] En el contexto de la presente invención, un antagonista adecuado es un agente que puede tener uno o más de los siguientes efectos, por ejemplo: interferir con la expresión de un marcador de células madre de cáncer; interferir con la activación de un mecanismo de transducción de señales de células madre señal de cáncer mediante, por ejemplo, la inhibición estérica de las interacciones entre un marcador de células madre de cáncer y su ligando, receptor o co-receptores; o unirse a un marcador de células madre de cáncer y desencadenar la muerte celular o inhibir la proliferación celular.

[0106] Los antagonistas contra un marcador de células madre de cáncer actúan extracelularmente para incidir sobre o inhibir la función de un marcador de células madre de cáncer, y son anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo extracelular de una proteína marcadora de células madre de cáncer. La unión extracelular de un antagonista contra un marcador de células madre de cáncer puede inhibir la señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer mediante la inhibición de la activación intrínseca (por ejemplo, actividad quinasa) de un marcador de células madre de cáncer y/o mediante la inhibición estérica de la interacción, por ejemplo, de un marcador de células madre de cáncer con su ligando, de un marcador de células madre de cáncer con su receptor, de un marcador de células madre de cáncer con un co-receptor, o de un marcador de células madre de cáncer con la matriz extracelular. Además, la unión extracelular de un antagonista contra un marcador de células madre de cáncer puede regular a la baja la expresión en la superficie celular de un marcador de células madre de cáncer, tal como, por ejemplo, mediante la internalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer y/o la disminución del tráfico en la superficie celular de un marcador de células madre de cáncer.

[0107] En algunas realizaciones, antagonistas contra un marcador de células madre de cáncer se unen a un marcador de células madre de cáncer y tienen uno o más de los efectos siguientes: inhibir la proliferación de células tumorales, desencadenar la muerte celular directamente en las células tumorales, o prevenir la metástasis de las células tumorales. En ciertas realizaciones, los antagonistas de un marcador de células madre de cáncer desencadenan la muerte celular a través de una toxina conjugada, agente quimioterapéutico, un radioisótopo, u otro de dichos agentes. Por ejemplo, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer está conjugado con una toxina que se activa en células tumorales que expresan el marcador de células madre de cáncer mediante internalización de proteínas. En otras realizaciones, los antagonistas de un marcador de células madre de cáncer median la muerte celular de una célula que expresa la proteína marcadora de células madre de cáncer a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC implica la lisis celular por células efectoras que reconocen la parte Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos tisulares, granulocitos y eosinófilos, por ejemplo, tienen receptores de Fc y pueden mediar en la citólisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol.12:1497). En algunas realizaciones, un antagonista de un marcador de células madre de cáncer es un anticuerpo que desencadena la muerte celular de células que expresan una proteína marcadora de células madre de cáncer mediante la activación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La CDC implica la unión de complemento de suero a la parte de Fc de un anticuerpo y la posterior activación de la cascada de proteínas del complemento, lo que resulta en daño de la membrana celular y finalmente la muerte celular. La actividad biológica de los anticuerpos es conocida por estar determinada, en gran medida, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue y Benacerraf, Textbook of Immunology, 2ª edición, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases se diferencian en este respecto, al igual que los anticuerpos de la misma subclase pero de diferentes especies. De anticuerpos humanos, IgM es la clase más eficiente de anticuerpo para unirse a complemento, seguido de IgG1, IgG3, e IgG2, mientras que IgG4 parece bastante deficiente en la activación de la cascada del complemento (Dillman, 1994, J. Clin Oncol 12:1497; Jefferis et al, 1998, Immunol Rev. 163. 59-76). De acuerdo con la presente invención, se preparan anticuerpos de las clases que tienen la actividad biológica deseada.

[0108] Puede analizarse la capacidad de cualquier anticuerpo particular contra un cáncer de células madre para mediar la lisis de la célula diana mediante la activación del complemento y/o ADCC. Las células de interés se cultivan y marcan in vitro; el anticuerpo se añade al cultivo de células en combinación con el complemento del suero o las células inmunes que pueden ser activadas por los complejos antígeno-anticuerpo. Se detecta la citólisis de las células diana, por ejemplo, mediante la liberación del marcador de las células lisadas. De hecho, los anticuerpos se pueden cribar utilizando suero del propio paciente como fuente del complemento y/o las células inmunes. El

anticuerpo que es capaz de activar el complemento o mediar en la ADCC en el ensayo in vitro se puede utilizar a continuación terapéuticamente en ese paciente en particular.

[0109] En otras realizaciones, los antagonistas de un marcador de células madre de cáncer pueden desencadenar indirectamente la muerte celular mediante la inhibición de la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y es un proceso fundamental requerido para el crecimiento normal, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la curación de heridas y en respuesta a la ovulación. El crecimiento de tumores sólidos más grandes de 1-2 mm² también requiere la angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno, sin el cual las células tumorales mueren. En ciertas realizaciones, por lo tanto, un antagonista de un marcador de células madre del cáncer reconoce células vasculares que expresan el marcador de células madre de cáncer incluyendo, por ejemplo, células endoteliales, células musculares lisas o componentes de la matriz extracelular necesarios para el montaje vascular. En otras realizaciones, un antagonista de un marcador de células madre de cáncer inhibe la señalización del factor de crecimiento vascular de células requeridas por reclutamiento, la concentración, el mantenimiento o la supervivencia.

Anticuerpos

[0110] Recientemente, se ha descubierto la aplicación de anticuerpos para reconocer células tumorales y se ha utilizado con éxito contra células B que expresan CD20 en linfoma no de Hodgkin y cánceres de mama que sobreexpresan HER2 y EGFR. Los anticuerpos contra receptores de factores de crecimiento pueden inhibir la función del receptor de factores de crecimiento, inhibiendo el crecimiento de células tumorales, así como haciendo que estas células sean más susceptibles a agentes citotóxicos. Además, los anticuerpos pueden mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos para eliminar los tumores que expresan un antígeno diana. Los anticuerpos también pueden estar directamente conjugados a toxinas o radioisótopos para mediar en la eliminación de células tumorales. Además, la supervivencia del tumor depende de la neovascularización y se ha utilizado con éxito la focalización de la angiogénesis a través de anticuerpos contra VEGF para prolongar la supervivencia del paciente.

[0111] La presente invención proporciona anticuerpos aislados contra un marcador de células madre del cáncer. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce específicamente el marcador de células madre de cáncer descrito. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido marcador de células madre de cáncer descrito en este documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos quiméricos o humanizados que se unen específicamente al dominio extracelular de un polipéptido marcador de células madre de cáncer descrito en este documento. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que se unen específicamente al dominio extracelular de un polipéptido marcador de células madre de cáncer descrito en este documento.

[0112] Los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer se utilizan en los métodos experimentales, de diagnóstico y terapéuticos descritas en este documento. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se usan para detectar la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer en muestras biológicas, tales como, por ejemplo, una biopsia de tejido de un paciente, derrame pleural, o muestra de sangre. Las biopsias de tejido se pueden seccionar y se puede detectar la proteína utilizando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Alternativamente, se aíslan las células individuales de una muestra y se detecta la expresión de proteínas en células fijas o vivas mediante análisis FACS. Además, los anticuerpos se pueden utilizar en matrices de proteínas para detectar la expresión de un marcador de células madre de cáncer, por ejemplo, en células tumorales, en lisados celulares, o en otras muestras de proteínas. En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales mediante el contacto de los anticuerpos con células tumorales en ensayos basados en células in vitro o en modelos animales in vivo. En aún otras realizaciones, los anticuerpos se usan para tratar el cáncer en un paciente humano mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer.

[0113] Los anticuerpos policlonales se pueden preparar por cualquier método conocido. Los anticuerpos policlonales se producen mediante la inmunización de un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, burro, etc) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente (un fragmento de péptido purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc) opcionalmente conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, etc diluido en solución salina estéril y combinado con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund) para formar una emulsión estable. El anticuerpo policlonal se recupera a continuación de la sangre, fluido ascítico y similares, de un animal inmunizado. La sangre recogida se coagula, y se decanta el suero, se clarifica por centrifugación, y se analiza el título de anticuerpo. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar a partir de suero o fluido ascítico de acuerdo con métodos estándar en la técnica, incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etcétera.

[0114] Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Usando el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster, u otro animal huésped apropiado, tal como se describió anteriormente para provocar la producción de anticuerpos por los linfocitos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que a continuación se pueden seleccionar separando de linfocitos y células de mieloma no fusionadas. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido, tal como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), a continuación se pueden propagar, ya sea en cultivo in vitro utilizando métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o in vivo como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden a continuación purificar a partir del medio de cultivo o fluido ascítico tal como se describe más arriba para los anticuerpos policlonales.

[0115] Alternativamente, también se pueden producir anticuerpos monoclonales usando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente de EE.UU. 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de las células B maduras o células de hibridoma, tales como mediante RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfecan en células huésped, tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células huésped. También, se pueden aislar anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de las especies deseadas a partir de bibliotecas de expresión en fagos tal como se ha descrito (Mc-Cafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0116] El polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal pueden modificarse adicionalmente de diferentes maneras utilizando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden sustituir 1) por las regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otras realizaciones, las regiones constantes están truncadas o eliminadas para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Además, la mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de alta densidad de la región variable se puede utilizar para optimizar la especificidad, afinidad, etc de un anticuerpo monoclonal.

[0117] Más generalmente, los anticuerpos modificados útiles en la presente invención se pueden obtener o derivar de cualquier anticuerpo. Además, el anticuerpo parental o precursor, o fragmento del mismo, utilizado para generar los anticuerpos modificados descritos puede ser murino, humano, quimérico, humanizado, de primate no humano o primatizado. En otras realizaciones, los anticuerpos modificados de la presente invención pueden comprender construcciones de anticuerpos de cadena sencilla (tales como los descritos en la patente de EE.UU. N ° 5.892.019), que tiene dominios constantes alterados tal como se describe en este documento. Por consiguiente, cualquiera de estos tipos de anticuerpos modificados de acuerdo con las enseñanzas del presente documento es compatible con la presente invención.

[0118] Según la presente invención, las técnicas se pueden adaptar para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para un polipéptido de la invención (véase la patente. De EE.UU. N ° 4.946.778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada para NOTCH, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos para un polipéptido de la invención pueden ser producidos mediante técnicas del sector, incluyendo, pero sin limitación: (a) un fragmento F(ab')₂ producido mediante la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.

[0119] Los anticuerpos biespecíficos también están dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un polipéptido antigénico de la invención (NOTCH. o un fragmento del mismo), mientras que la segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de superficie celular o receptor o subunidad del receptor.

[0120] Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza generalmente mediante cromatografía de afinidad.

[0121] Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas pueden fusionarse con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, regiones CH2 y CH3. La primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera puede estar presente en por lo menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Los detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos se pueden encontrar en Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0122] Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos. Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando la unión química. Además, Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se cortan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂.

[0123] Adicionalmente, los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. Coli* y se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992)). Estos métodos se pueden utilizar en la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado.

[0124] También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos (Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991)).

[0125] Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido de la invención. Alternativamente, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG con el fin de dirigir los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante radionucleido, tal como EOTUBE, DTPA, DOTA, o TETA.

[0126] Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (patente de EE.UU. N° 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

[0127] Para los fines de la presente invención, se debe entender que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporciona la asociación del anticuerpo con los polipéptidos de NOTCH. En este sentido, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que puede ser inducido para montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado a un tumor deseado. Por tanto, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos *cynomolgus*, macacos, etc) o de origen lupino. En algunas realizaciones, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras realizaciones, las regiones variables de anticuerpos compatibles (normalmente derivados de una fuente no humana) pueden ser diseñadas o adaptadas específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este aspecto, las regiones variables útiles en la presente invención pueden ser humanizadas o en cualquier modo alterarse a través de la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

[0128] En algunas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo monoclonal contra un marcador de células madre de cáncer es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) en las regiones variables. Dichos anticuerpos se utilizan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y respuestas HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administra a un sujeto humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos con un mínimo o ninguna secuencia no humana. Un anticuerpo humano es un anticuerpo

producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un ser humano.

[0129] Los anticuerpos humanizados se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector. Un anticuerpo se puede humanizar mediante la sustitución de la CDR de un anticuerpo humano por la de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente mediante la sustitución de un residuo adicional en la región armazón de Fv y/o en los residuos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

[0130] Los anticuerpos humanizados se pueden preparar directamente utilizando varias técnicas conocidas en el sector. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados in vitro o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; and U.S. Patent 5,750,373). Además, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca de fagos, donde la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanizados también se pueden producir en ratones transgénicos que contienen locus de inmunoglobulina humana que son capaces tras la inmunización de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Esta estrategia se describe en las patentes de Estados Unidos 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

[0131] Como alternativa a la humanización, se pueden genera anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de 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 cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da lugar a una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humanas en dichos ratones mutantes en la línea germinal darán lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación de antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33 (1993); patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (todas de GenPharm); 5,545,807; y WO 97/17852.

[0132] Alternativamente, la tecnología de expresión en fagos se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos. Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Se ha aislado un conjunto diverso de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos).

[0133] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas in vitro (véase la patente de Estados Unidos Nos. 5,567,610 y 5,229,275).

[0134] Se entenderá que el injerto de los dominio variables no humanos completos en regiones constantes humanas producirán anticuerpos quiméricos "clásicos". En el contexto de la presente solicitud, el término "anticuerpos quiméricos" se mantendrá que significa cualquier anticuerpo en el que la región o sitio inmunoreactivo se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede ser intacta, parcial o modificada según la presente invención) se obtiene de una segunda especie. En algunas realizaciones, la región o sitio de unión a antígeno será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón) y la región constante es humana. Aunque la especificidad inmunogénica de la región variable no está en general afectada por su fuente, una región constante humana es menos probable que produzca una respuesta inmune de un sujeto humano que lo haga la región constante de una fuente no humana.

[0135] Los dominios variables en las cadenas tanto pesadas como ligeras se alteran mediante por lo menos la sustitución parcial de una o más CDR y, si es necesario, mediante la sustitución parcial de la región armazón y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones armazón, se prevé que las CDR derivarán de un anticuerpo de diferente clase y preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Debe hacerse hincapié en que puede que no sea

necesario sustituir todas las CDR por las CDR completas de la región variable de donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. En cambio, puede ser sólo necesario transferir los residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Teniendo en cuenta las explicaciones expuestas en la patentes de EE.UU. Nos. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estarán en el estado de la técnica, ya sea mediante la realización de experimentos de rutina o mediante el análisis de prueba y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

[0136] Sin embargo en las alteraciones en la región variable, se entenderá que los anticuerpos modificados de la presente invención comprenderán anticuerpos, o fragmentos inmunorreactivos de los mismos, en los que por lo menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se ha eliminado o en cualquier caso alterado con el fin de proporcionar características bioquímicas deseadas tales como el aumento de la localización del tumor o reducción de la vida media en suero en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatibles con la presente invención comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en este documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio constante de cadena ligera (CL). En algunas realizaciones de la invención, se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios están eliminados parcial o totalmente. En otras realizaciones, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes con dominios eliminados en las que todo el dominio CH2 ha sido eliminado (construcciones Δ CH2). En aún otras realizaciones, el dominio de la región constante omitido será reemplazado por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular típicamente impartida por la región constante ausente.

[0137] Además de su configuración, se sabe en la técnica que la región constante media en varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento estimula también la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, con un sitio del receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existe una serie de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluidos IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares provoca una serie de respuestas biológicas importantes y diversas, incluyendo la inmersión y la destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la depuración de complejos inmunes, la lisis de células diana recubiertas de anticuerpos por células asesinas (llamada citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina. Aunque se han estudiado en cierta medida varios receptores de Fc y sitios de receptores, todavía hay mucho que no se sabe acerca de su ubicación, la estructura y el funcionamiento.

[0138] Aunque sin limitar el alcance de la presente invención, se cree que los anticuerpos que comprenden regiones constantes modificadas tal como se describe en este documento proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales o por otros medios) de un dominio de la región constante pueden reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando de este modo la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de las regiones constantes, de conformidad con la presente invención, moderen la unión a complemento y por lo tanto reduzcan la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante para eliminar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten mejorar la localización debido al aumento de especificidad de antígeno o flexibilidad del anticuerpo. De manera similar, las modificaciones en la región constante de acuerdo con la presente invención se pueden preparar fácilmente utilizando técnicas conocidas bioquímicas o de ingeniería molecular.

[0139] Se observará que los anticuerpos modificados pueden ser diseñados para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra de los anticuerpos modificados respectivos. En otras construcciones, puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, se podrían expresar construcciones compatibles en los que el dominio CH2 ha sido eliminado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) está unido a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Dicho espaciador puede ser añadido, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra siga siendo flexible. Sin embargo, cabe señalar que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, llegar a ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmune no deseada contra la construcción. En consecuencia, cualquier espaciador añadido a la construcción debe ser relativamente no inmunogénico o, incluso omitirse por completo si se pueden mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

[0140] Además de la delección de los dominios de región constante completos, se entenderá que pueden proporcionarse los anticuerpos de la presente invención mediante la delección o sustitución parcial de unos pocos o incluso un único aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en zonas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y por lo tanto aumentar la localización del tumor. De manera similar, puede ser deseable simplemente eliminar esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión a CLQ de complemento) a modular. Dichas delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero), dejando intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante en cuestión. Además, como se ha indicado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejoran el perfil de la construcción resultante. En este aspecto, puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservada (por ejemplo, unión a Fc), mientras que se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Sin embargo, otras realizaciones pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar características deseables, tales como la función efectora, o para proporcionar más unión a citotoxina o hidratos de carbono. En dichas realizaciones, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

[0141] La presente invención también comprende anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente un marcador de células madre de cáncer. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente a por lo menos dos epítopos diferentes. Los diferentes epítopos pueden estar en la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido marcador de células madre de cáncer) o en diferentes moléculas de tal manera, de manera que, por ejemplo, los anticuerpos pueden reconocer y unirse específicamente a un marcador de células madre de cáncer, así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora en un leucocito, tal como un receptor de células T (por ejemplo, CD3) o receptores de Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) o 2) un agente citotóxico tal como se describe en detalle a continuación. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos. Las técnicas para producir anticuerpos biespecíficos son comunes en la técnica (Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 122:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; y la patente de EE.UU 5.731.168).

[0142] En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración del tumor, por ejemplo. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivan mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 y Brennan et al., 1985, Science, 229:81). Sin embargo, estos fragmentos se producen habitualmente ahora directamente mediante células huésped recombinantes tal como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, y scFv pueden expresarse todos en y secretarse a partir de E. coli u otras células huésped, lo que permite la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Alternativamente, dichos fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo también pueden ser anticuerpos lineales tal como se describe en la patente de EE.UU. 5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos.

[0143] Puede ser deseable adicionalmente, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo a efectos de incrementar la vida media en el suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor salvaje en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en un péptido etiqueta que a continuación se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro (por ejemplo, por síntesis de ADN o péptidos)

[0144] La presente invención abarca además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, establecidos en este documento. Estos pueden contener, por ejemplo, las mutaciones de sustitución conservativa, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general, tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Lo que se pretende por una sustitución conservativa de aminoácidos es bien conocido en la técnica.

[0145] La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), isótopos radiactivos (es decir, un radioconjugado), etc. Entre los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes de intercalación.

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados incluyendo ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se producen usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiliditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). También se pueden utilizar conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de la toxina.

[0146] Los anticuerpos conjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (patente EE.UU. N ° 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

[0147] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención contiene regiones Fc humanas que se modifican para mejorar la función efectora, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente de antígeno mediada por células (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Esto se puede lograr mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden introducir un residuo o residuos de cisteína en la región Fc para permitir la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región para mejorar la muerte celular mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Caron et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, 1992, Immunol 148:2918-2922). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral aumentada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al., 1993, Cancer Research 53:2560-2565. Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales (Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

[0148] Independientemente de cómo se obtienen las cantidades útiles, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en cualquiera de un conjunto de formas conjugadas (es decir, un inmunoconjugado) o formas no conjugadas. Alternativamente, los anticuerpos de esta invención se pueden utilizar en una forma no conjugada o "desnudo" para aprovechar los mecanismos de defensa naturales del sujeto, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDC) y la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para eliminar las células malignas. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden conjugar con radioisótopos, tales como ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re usando cualquiera de un conjunto de quelantes bien conocidos o marcaje directo. En otras realizaciones, las composiciones descritas pueden comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o modificadores de la respuesta biológica, tales como el metotrexato, adriamicina, y linfoquinas tales como el interferón. Todavía otras realizaciones de la presente invención comprenden el uso de anticuerpos conjugados con biotoxinas específicas tales como ricina o la toxina de la difteria. En aún otras realizaciones, los anticuerpos modificados pueden formar complejos con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos) en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora tal como una célula T. La selección de qué anticuerpo modificado conjugado o no conjugado a utilizar dependerá del tipo y etapa del cáncer, el uso de tratamiento adyuvante (por ejemplo, la quimioterapia o la radiación externa) y el estado del paciente. Se entenderá que se podría fácilmente hacer una selección en vista de las enseñanzas en este documento.

Ensayos de unión a anticuerpo

[0149] Los anticuerpos de la presente invención pueden ensayarse para la unión inmuno-específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos inmuno que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como el análisis BIAcore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación al complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

[0150] En algunas realizaciones de la presente invención, la inmunoespecificidad de un anticuerpo contra un marcador de células madre del cáncer se determina utilizando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno, cubrir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con antígeno, añadir el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer conjugado con un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. Alternativamente, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer no está conjugado con un compuesto detectable, pero en cambio, un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se añade al pocillo. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede recubrir el pocillo y se puede añadir un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Se conocen en la técnica los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA (véase, por ejemplo Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en 11.2.1).

[0151] La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno marcador de células madre de cáncer y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno se pueden determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I), o fragmento o variante de la misma, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar seguido por la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer y las velocidades de disociación de unión se pueden determinar a partir de los datos por análisis de representación de Scatchard. En algunas realizaciones, se utiliza el análisis cinético BIAcore para determinar las velocidades de unión en asociación y disociación de anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de anticuerpos a partir de chips con antígenos marcadores de células madre de cáncer inmovilizados en su superficie.

Polinucleótidos

[0152] En el presente documento se describen polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 7-17 y 19, así como los polinucleótidos de SEQ ID NOS: 1, 4, 6 y 18. Los polinucleótidos pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, en el que ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, y si es cadena sencilla, puede ser la cadena codificante o no codificante (antisentido).

[0153] De este modo, el término "polinucleótido que codifica un polipéptido" comprende un polinucleótido que incluye sólo secuencias codificantes para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias adicionales codificantes y/o no codificantes.

[0154] También se describen variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en este documento que codifican fragmentos, análogos, y derivados. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica natural del polinucleótido o una variante no natural del polinucleótido.

[0155] Tal como se indica anteriormente en este documento, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica natural de la secuencia codificante de los polipéptidos descritos. Tal como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia de polinucleótido que tiene una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente la función del polipéptido codificado.

[0156] También se describen polinucleótidos, en los que la secuencia codificante para el polipéptido maduro se puede fusionar en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped, por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde permanece una proteína activa madura.

[0157] De este modo, por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una proteína madura, o una proteína que tiene una prosequencia o una proteína que tiene tanto una prosequencia como una presequencia (secuencia líder).

[0158] Los polinucleótidos también pueden tener la secuencia codificante fusionada en marco con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexa-histidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado con el marcador en el caso de un huésped bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se utiliza un huésped mamífero, por ejemplo, células COS-7. La etiqueta HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson, L, et al., Cell, 37:767 (1984)).

[0159] También se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos el 90% idéntica, 95% idéntica, y en algunas realizaciones, por lo menos 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica, con las secuencias descritas.

5 [0160] Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia se pretende indicar que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos por lo menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, se pueden eliminar o sustituir hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia por otro nucleótido, o se puede insertar en la secuencia de referencia un número de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

20 [0161] De forma práctica, si alguna molécula de ácido nucleico es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de referencia se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos, tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se fijan, naturalmente, de manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permiten los espacios en la homología en hasta un 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

30 [0162] Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones o eliminaciones, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Las variantes de nucleótidos pueden producirse mediante sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por una serie de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Polipéptidos

40 [0163] Se describen en este documento polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que tienen la secuencia de las SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 7-17 y 19, así como los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de SEQ ID NOS:1, 4, 6 y 18.

45 [0164] Se entenderá en la técnica que se pueden variar algunas secuencias de aminoácidos de la invención sin un efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Si se contemplan dichas diferencias en la secuencia, debe recordarse que habrán áreas críticas en la proteína que determinan la actividad.

50 [0165] También se describen variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de proteína NOTCH, tal como partes de la proteína aquí descritas. Dichos mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo. Tal como se indica anteriormente, en Bowie, J.U., et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," *Science* 247:1306-1310 (1990) se puede encontrar una guía referente a qué cambios de aminoácidos son probablemente fenotípicamente silenciosos.

55 [0166] Por lo tanto, los fragmentos, derivados, o análogos de los polipéptidos de la invención pueden ser: (i) aquel en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (a menudo un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, o (ii) aquel en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente, o (iii) aquel en el que el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) aquel en el que los aminoácidos adicionales se fusionan con el polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Dichos fragmentos, derivados y análogos se consideran dentro del alcance de las enseñanzas del presente documento.

65 [0167] De particular interés son las sustituciones de aminoácidos cargados por otro aminoácido cargado y por aminoácidos neutros o cargados negativamente. Los últimos dan lugar a proteínas con carga positiva reducida para

mejorar las características de la proteína NOTCH. Es altamente deseable la prevención de la agregación. La agregación de proteínas no sólo da lugar a la pérdida de actividad sino que también puede ser problemática cuando se preparan formulaciones farmacéuticas, debido a que pueden ser inmunogénicas. (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36:838-845 (1987); Cleland et al. Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)).

[0168] Tal como se indica, los cambios son habitualmente de menor naturaleza, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos que no afectan significativamente el plegado o actividad de la proteína (véanse las tablas 1 y 2).

10 TABLA 1. Sustituciones conservativas de aminoácidos

Aromático	Fenilalanina Triptófano Tirosina
Hidrofóbico	Leucina Isoleucina Valina
Polar	Glutamina Asparagina
Básico	Arginina Lisina Histidina
Ácido	Ácido aspártico Ácido glutámico
Pequeño	Alanina Serina Treonina Metionina Glicina

15 Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones	Sustituciones de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Pre; norleucina
Leu (L)	Ile	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina

[0169] Naturalmente, el número de sustituciones de aminoácidos realizadas depende de muchos factores, incluyendo los descritos anteriormente. Hablando en general, el número de sustituciones para cualquier polipéptido NOTCH determinado no será superior a 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ó 3.

[0170] Los polipéptidos y polinucleótidos se proporcionan en forma aislada y a veces, se purifican hasta homogeneidad.

[0171] Los polipéptidos incluyen los polipéptidos de las SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 7-17 y 19, así como polipéptidos que tienen por lo menos 90% de similitud (a veces, por lo menos 90% de identidad) con los polipéptidos de las SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 7-17 y 19, y por lo menos 95% de similitud (a veces, por lo menos 95% de identidad) con los polipéptidos de las SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 7-17 y 19, y en otras realizaciones, 96%, 97%, 98%, ó 99% de similitud (a veces 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad) con los polipéptidos de las SEQ ID NOS: 2, 3, 5, 7 - 17 y 19. Tal como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

[0172] Se pueden emplear fragmentos o partes de los polipéptidos para producir el correspondiente polipéptido de longitud completa mediante síntesis de péptidos; por lo tanto, pueden emplearse los fragmentos como intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa. Se pueden utilizar fragmentos o partes de los polinucleótidos de la presente invención para sintetizar polinucleótidos de longitud completa de la presente invención.

[0173] Un fragmento de las proteínas es una parte o la totalidad de una proteína que es capaz de unirse a una proteína marcadora de células madre de cáncer o la pareja de unión de la proteína de células madre de cáncer (por ejemplo, un receptor, coreceptor, ligando, o coligando). Este fragmento tiene una alta afinidad por una proteína marcadora de células madre de cáncer o pareja de unión de la proteína de células madre de cáncer (por ejemplo, un receptor, coreceptor, ligando, o coligando). Ciertos fragmentos de proteínas de fusión son fragmentos de proteína que comprenden por lo menos parte de la parte extracelular de una proteína marcadora de células madre de cáncer o pareja de unión de la proteína de células madre de cáncer unida a por lo menos parte de una región constante de una inmunoglobulina. La afinidad está habitualmente en el intervalo de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-12} M, aunque la afinidad puede variar considerablemente con fragmentos de diferentes tamaños, que van de 10^{-7} a 10^{-13} M. En algunas realizaciones, el fragmento tiene aproximadamente 10-110 aminoácidos de longitud y comprende el sitio de unión a ligando de la proteína marcadora de células madre de cáncer unido a por lo menos parte de una región constante de una inmunoglobulina.

[0174] Los polipéptidos y análogos se pueden modificar adicionalmente para contener grupos químicos adicionales que no forman parte normalmente de la proteína. Los grupos derivados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los grupos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto deseable de las proteínas y similares. Un resumen sobre estos grupos se puede encontrar en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

[0175] Los polipéptidos aislados descritos en este documento pueden producirse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos abarcan desde métodos de síntesis directa de proteínas a la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aisladas y expresión de aquellas secuencias en un huésped transformado adecuado. Por ejemplo, el ADNc se puede obtener mediante el cribado de una biblioteca de ADNc humano con un fragmento de ADN marcado que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y la identificación de clones positivos mediante autorradiografía. Se realizan rondas adicionales de purificación en placa e hibridación utilizando métodos convencionales.

[0176] En algunas realizaciones de un procedimiento recombinante, se construye una secuencia de ADN aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína de tipo salvaje de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse mediante mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Véase, por ejemplo Zoeller et al., Proc-Nat. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) y la patente de EE.UU. N ° 4.588.585. Otro método de construcción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés sería mediante síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse en base a la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionarse aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que el polipéptido recombinante de interés se produce.

[0177] Los métodos estándar se pueden aplicar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede utilizar una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen traducido de forma inversa. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican partes del polipéptido deseado y a continuación se ligan. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente salientes 5 'o 3' para el ensamblaje complementario.

[0178] Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagénesis dirigida de sitio u otro método), las secuencias de ADN mutantes que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se unen operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje adecuado se puede confirmar mediante la secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricciones y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Tal como se conoce en la técnica, a efectos de obtener niveles elevados de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen se

une operativamente a secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

[0179] Se utilizan vectores de expresión recombinantes para amplificar y expresar ADN que codifica fusiones de polipéptidos marcadores de células madre de cáncer. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una fusión de polipéptidos marcadores de células madre de cáncer o un análogo bioequivalente unido operativamente a elementos reguladores de la transcripción o de la traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, microbianos, virales o de insectos. Una unidad transcripcional generalmente comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, tal como se describe en detalle a continuación. Dichos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Adicionalmente se puede incorporar la capacidad para replicarse en un huésped, generalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (secuencia líder secretora) está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado para permitir la traducción. Generalmente, unida operativamente significa contigua y, en el caso de secuencias líderes secretoras, significa contigua y en el marco de lectura. Los elementos estructurales destinados a su uso en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo opcionalmente se puede escindir posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

[0180] La elección de la secuencia de control de la expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Se puede utilizar una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y cytomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Esherichia coli*, que incluyen pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de rango de huéspedes más amplio, tales como M13 y fagos de ADN de cadena única filamentosos.

[0181] Las células huésped adecuadas para la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer incluyen células procariotas, de levadura, insectos o eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativo o gram positivo, por ejemplo, *E. Coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se describe a continuación. También se podrían utilizar sistemas de traducción libres de células. Los vectores de clonación y expresión adecuados para usar con huéspedes celulares de bacterias, hongos, levadura y mamífero se describen por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985).

[0182] También se utilizan de manera ventajosa varios sistemas de cultivo de células de mamífero o insectos para expresar una proteína recombinante. Se puede realizar la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero porque dichas proteínas en general se plegan correctamente, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes de mamífero adecuados se incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (*Cell* 23:175, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado que incluyen, por ejemplo, células L, líneas celulares C127, 3T3, ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y potenciador unido al gen a expresar y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' ó 3', y secuencias no traducida 5' ó 3', tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos se revisa en Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988).

[0183] Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse según cualquier procedimiento adecuado. Dichos métodos estándar incluyen la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad y en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de cubierta de la gripe y la glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir la purificación fácil mediante el paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente usando técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

65

[0184] Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan la proteína recombinante en medios de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, se puede utilizar una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos utilizados habitualmente en la purificación de proteínas. Alternativamente, se puede utilizar una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Por último, se pueden utilizar una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios hidrófobos de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos colgantes de metilo u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición de proteína de células madre de cáncer-Fc. También se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

[0185] La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se aísla generalmente por extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguido por una o más etapas de concentración, precipitación por sales, cromatografía de intercambio iónico acuoso o exclusión de tamaño. Se puede utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisado celular.

Inhibición del crecimiento de células tumorales

[0186] En este documento se describen métodos para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer utilizando los antagonistas de un marcador de células madre de cáncer descritos en este documento. El método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer puede comprender poner en contacto la célula con un antagonista contra un marcador de células madre de cáncer in vitro. Por ejemplo, se cultivan una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa un marcador de células madre de cáncer en un medio al que se añade un antagonista del marcador de células madre de cáncer expresado para inhibir el crecimiento celular. Alternativamente, se aíslan células tumorales y/o células madre de tumor a partir de una muestra del paciente, tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural, o muestra de sangre y se cultivan en medio al que se añade un antagonista de un marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento celular. El antagonista es un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo de una proteína marcadora de células madre de cáncer. Por ejemplo, se pueden añadir anticuerpos contra una proteína marcadora de células madre de cáncer al medio de cultivo de las células madre de cáncer aisladas para inhibir el crecimiento celular.

[0187] El método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer puede comprender poner en contacto la célula con un antagonista contra un marcador de células madre de cáncer in vivo. El contacto de una célula tumorigénica con un antagonista para un marcador de células madre de cáncer se puede realizar en un modelo animal. Por ejemplo, se desarrollan xenoinjertos que expresan un marcador de células madre de cáncer en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que son administrados con un antagonista para un marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento del tumor. Alternativamente, las células madre de cáncer que expresan un marcador de células madre de cáncer se aíslan de una muestra del paciente, tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural, o muestra de sangre y se inyectan en ratones inmunocomprometidos que a continuación son administrados con un antagonista contra el marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento de células tumorales. El antagonista de un marcador de células madre de cáncer se puede administrar al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento del tumor, o se administra como agente terapéutico después de que las células tumorigénicas hayan crecido hasta un tamaño específico. El antagonista es un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo de un marcador de células madre de cáncer. Poner en contacto una célula tumorigénica con un antagonista de una célula madre de cáncer puede realizarse en un paciente humano diagnosticado con cáncer, en el que el antagonista es un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo de un marcador de células madre de cáncer.

Composición farmacéuticas

[0188] La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas tal como se define en la reivindicación 20. Estas composiciones farmacéuticas son útiles en la inhibición del crecimiento de células tumorales y el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

[0189] Las formulaciones se preparan para su almacenamiento y uso mediante la combinación de un antagonista purificado (por ejemplo, anticuerpo) de la presente invención con un vehículo, excipiente y/o estabilizador farmacéuticamente aceptables en forma de polvo liofilizado estéril, solución acuosa, etc (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos, excipientes o estabilizadores adecuados comprenden tampones no tóxicos, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales, tales como

5 cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol
 10 butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; hidratos de carbono, tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína), y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, o polietilenglicol (PEG).

15 [0190] La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en cualquiera de una serie de maneras para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a membranas mucosas que incluyen liberación vaginal y rectal), tal como parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral, incluyendo inyección o infusión intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

20 [0191] La formulación terapéutica puede estar en forma de dosificación unitaria. Dichas formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios para la administración oral, parenteral o rectal o para la administración por inhalación. En las composiciones sólidas, tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico. Entre los ingredientes de formación de comprimidos convencionales se incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo no tóxica. La composición de preformulación sólida se subdivide a continuación en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente. Los comprimidos, píldoras, etc de la nueva composición pueden recubrirse o en cualquier caso componerse para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente externo. Además, los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación y permite que el componente interno pase intacto a través del estómago o que se retrase en la liberación. Se puede utilizar una variedad de materiales para dichas capas o recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

40 [0192] Las formulaciones farmacéuticas incluyen antagonistas de la presente invención complejados con liposomas (Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; y las patentes de EE.UU. 4.485.045 y 4.544.545). Los liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la patente de EE.UU. 5.013.556. Algunos liposomas se pueden generar mediante evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

45 [0193] El antagonista también puede estar atrapado en microcápsulas. Dichas microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones descritas en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

55 [0194] Además, se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen polímeros poliésteres, hidrogeles tales como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (patente de EE.UU. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-7 L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa, y poli-D(-)-3-hidroxibutírico .

Tratamiento con antagonistas

65 [0195] Se prevé que los antagonistas de la presente invención se puedan usar para tratar diversas afecciones caracterizadas por la expresión y/o aumento de la capacidad de respuesta de las células a un marcador de células madre de cáncer. En particular, se prevé que los antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) contra un marcador de

células madre de cáncer se puedan usar para tratar trastornos proliferativos que incluyen, pero sin limitación, tumores benignos y malignos del riñón, hígado, vejiga, mama, estómago, ovario, colon, recto, próstata, pulmón, vulva, tiroides, cabeza y cuello, cerebro (glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, etc), la sangre y la linfa (leucemias y linfomas).

[0196] Los antagonistas se administran como una composición farmacéutica apropiada para un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos. El método adecuado de administración incluye la administración intravenosa como un bolo o mediante perfusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación.

[0197] En algunas realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un antagonista de la presente invención y un agente quimioterapéutico o un cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un antagonista puede producirse antes de, simultáneamente con, o posteriormente a la administración de quimioterapias. Las quimioterapias contempladas por la invención incluyen sustancias químicas o fármacos que son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, tales como doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, carboplatino y vinblastina. La administración combinada puede incluir la coadministración, ya sea en una sola formulación farmacéutica o usando formulaciones separadas, o la administración consecutiva en cualquier orden, pero generalmente dentro de un período de tiempo, de manera que todos los agentes activos pueden ejercer simultáneamente sus actividades biológicas. Las pautas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones de los fabricantes o según se determina empíricamente. Las pautas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., MC Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

[0198] En otras realizaciones, el tratamiento implica la administración combinada de un antagonista de la presente invención y la terapia de radiación. El tratamiento con un antagonista puede tener lugar antes de, simultáneamente a, o posteriormente a la administración de terapia de radiación. Se puede utilizar cualquier pauta de dosificación para dicha terapia de radiación.

[0199] En otras realizaciones, el tratamiento puede implicar la administración combinada de anticuerpos de la presente invención con otros anticuerpos contra antígenos asociados a tumor adicionales, incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos que se unen al receptor de EGF (EGFR) (Erbix®), el receptor de erbB2 (HER2) (Herceptin®), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Avastin®). Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citoquinas, puede ir acompañado de la extirpación quirúrgica de las células cancerosas o cualquier otra terapia considerada necesaria por un médico a cargo.

[0200] Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un antagonista de la presente invención depende del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, si el antagonista se administra para fines terapéuticos o preventivos, la terapia anterior, el historial clínico del paciente, y así sucesivamente todos a la discreción del médico a cargo. El antagonista se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran de varios días a varios meses, o hasta que se efectúa la cura o se logra una disminución del estado patológico (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor). Las pautas de dosificación óptimas pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y pueden variar dependiendo de la potencia relativa de un antagonista del individuo. El médico encargado puede determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. En general, la dosis es de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. El médico a cargo puede estimar las tasas de repetición para la dosificación sobre la base de tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales.

Kits

[0201] También se describen kits que se pueden utilizar para llevar a cabo los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, un kit comprende un anticuerpo o anticuerpos específicos para un marcador de células madre de cáncer, un anticuerpo o anticuerpos purificados, en uno o más recipientes. En algunas realizaciones, un kit comprende además un polipéptido marcador de células madre de cáncer sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con el anticuerpo o anticuerpos incluidos en el kit, un anticuerpo de control que no reacciona con el polipéptido marcador de células madre de cáncer, y/o un medio para detectar la unión de un anticuerpo a un polipéptido marcador de células madre de cáncer (tal como, por ejemplo, un cromóforo fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente conjugado al anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer o a un segundo anticuerpo que reconoce el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer). En otras realizaciones, un kit comprende reactivos específicos para la detección de ARNm o ADNc (por ejemplo, sondas de oligonucleótidos o cebadores) de uno o más marcadores de células madre de cáncer. En algunas realizaciones, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para llevar a cabo un ensayo de detección,

incluyendo todos los controles, las directrices para la realización de los ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y presentación de los resultados.

[0202] Un kit de compartimientos incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes separados. Dichos recipientes incluyen recipientes de vidrio pequeños, recipientes de plástico o tiras de plástico o de papel. Dichos recipientes permiten transferir eficientemente reactivos de un compartimento a otro compartimento de modo que las muestras y los reactivos no se contaminan de forma cruzada, y los agentes o soluciones de cada recipiente pueden añadirse de una manera cuantitativa de un compartimento a otro. Dichos recipientes incluirán un recipiente que aceptará la muestra de ensayo, un recipiente que contiene los anticuerpos o sondas utilizadas en los métodos, recipientes que contienen reactivos de lavado (tales como, solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, etc), y contenedores que contienen los reactivos utilizados para detectar el anticuerpo o sonda unidos. Se entenderá fácilmente que los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos descritos de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

Métodos de cribado

[0203] También se describe un método de identificación de una molécula que se une a una región de unión a no ligando de un dominio extracelular de un receptor NOTCH humano e inhibe el crecimiento de las células tumorales, comprendiendo el método: i) incubar la molécula con el dominio de unión a no ligando del dominio extracelular del receptor NOTCH humano, ii) determinar de si la molécula se une a la región de unión a no ligando del dominio extracelular del receptor NOTCH humano, y iii) determinar si la molécula inhibe el crecimiento de las células tumorales. Las moléculas que se unen específicamente a una región de unión a no ligando de un dominio extracelular de un receptor NOTCH humano incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, polipéptidos, y anticuerpos.

[0204] El cribado puede realizarse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el cribado se lleva a cabo in vitro. En algunas realizaciones, las células que expresan una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano se incuban con una molécula marcada y se determina la unión específica de la molécula marcada a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano mediante análisis FACS. En algunas realizaciones, se expresa una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano mediante la expresión en fagos, y se identifican moléculas que se unen específicamente a una región de no unión del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano. Otros métodos adecuados para la identificación de moléculas que se unen específicamente a una región de unión a no ligando de un receptor NOTCH humano incluyen, pero sin limitación, ELISA, Western (o inmuno)transferencia, y el doble híbrido de levadura.

[0205] A continuación, se analizan las moléculas que se unen específicamente a una región de unión a no ligando de un dominio extracelular de un receptor NOTCH humano por la inhibición del crecimiento de células tumorales. El análisis puede llevarse a cabo utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, se analizan las moléculas que se unen específicamente a la región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano por la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral in vitro. En algunas realizaciones, las moléculas que se unen específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano se incuban con células tumorales en un cultivo y se determina la proliferación de células tumorales en presencia de una molécula que se une específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano y se compara con células tumorales incubadas con una molécula de control de no unión. En ciertas realizaciones, se analizan las moléculas que se unen específicamente a la región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano por la capacidad de inhibir el crecimiento del tumor in vivo. En ciertas realizaciones, se inyectan moléculas que se unen específicamente a una región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano en un modelo de xenoinjerto animal y se determina el crecimiento de tumores en los animales tratados con moléculas que se unen específicamente a la región de unión a no ligando del dominio extracelular de un receptor NOTCH humano y se compara con los animales tratados con una molécula de control de no unión.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos

Producción de antígenos

[0206] Se generaron anticuerpos contra la región de unión a no ligando de NOTCH1 y NOTCH2.

[0207] En ciertas realizaciones, se generaron fragmentos de polipéptidos recombinantes del dominio extracelular de NOTCH1 humano como antígenos para la producción de anticuerpos. Se utilizó tecnología de ADN recombinante

estándar para aislar polinucleótidos que codifican los aminoácidos 1-220 de NOTCH1 (SEQ ID NO: 1) y los aminoácidos 1427-1563 de NOTCH1 (SEQ ID NO: 18). Estos polinucleótidos se unieron por separado en N-terminal en el marco a un Fc humano y una etiqueta de histidina y se clonaron en vector plasmídico de transferencia para la expresión mediada por baculovirus en células de insectos. Se utilizaron protocolos estándar de transfección, infección y cultivo celular para producir células de insectos recombinantes que expresan los correspondientes polipéptidos NOTCH1 correspondientes a las repeticiones 1-5 de EGF (SEQ ID NO: 2) y las repeticiones 10-15 de EGF (SEQ ID NO: 19) (O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)).

[0208] La escisión de la secuencia señal endógena de NOTCH1 se aproximó utilizando el software de predicción de escisión SignalP 3.0 entre el aminoácido 18 y 19, aunque el punto de escisión in vivo real puede diferir en un par de aminoácidos en cualquier dirección. Por lo tanto, la proteína antígeno de NOTCH1 correspondiente a las repeticiones 1-5 de EGF comprende aproximadamente el aminoácido 19 al aminoácido 220 (SEQ ID NO: 3). La proteína antígeno se purificó a partir de lisados de células de insecto usando cromatografía de afinidad de proteína A y quelato con Ni ++. La proteína antígeno purificada se dializó frente a PBS (pH = 7), se concentró hasta aproximadamente 1 mg/ml, y se filtró de forma estéril en la preparación para la inmunización.

[0209] En ciertas realizaciones, se generaron fragmentos de polipéptidos recombinantes del dominio extracelular de NOTCH2 humano como antígenos para la producción de anticuerpos. Se utilizó la tecnología del ADN recombinante estándar para aislar un polinucleótido que codifica los aminoácidos 1-493 de Notch2 (SEC ID N°: 1). Este polinucleótido se ligó en el marco N-terminal a una etiqueta de Fc humano o etiqueta de histidina y se clonó en un vector plasmídico de transferencia para la expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Se utilizaron protocolos estándar de transfección, infección y cultivo celular para producir células de insecto recombinantes que expresan el correspondiente polipéptido Notch2 (O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)).

[0210] La escisión de la secuencia señal endógena de Notch2 humano se aproximó utilizando el software de predicción de la escisión SignalP 3.0, aunque el punto de escisión in vivo real puede diferir en un par de aminoácidos en cualquier dirección. La escisión predicha de Notch2 es entre los aminoácidos 1 y 26, por lo tanto la proteína antigénica de Notch2 comprende aproximadamente del aminoácido 27 hasta el aminoácido 493. La proteína antígeno se purificó a partir de medio condicionado con células de insectos utilizando cromatografía de afinidad de proteína A y de quelato con Ni ++. La proteína antígeno purificada se dializó a continuación frente a PBS (pH = 7), se concentró hasta aproximadamente 1 mg/ml, y se filtró de forma estéril en la preparación para la inmunización.

Inmunización

[0211] Se inmunizaron ratones (n = 3) con proteína antigénica NOTCH1 o NOTCH2 purificadas (Antibody Solutions; Mountain View, CA) usando técnicas estándar. La sangre de los ratones individuales se cribó aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento del antígeno mediante análisis ELISA y FACS (descrito en detalle a continuación). Los dos animales con los títulos más elevados de anticuerpos fueron seleccionados para el refuerzo final de antígeno, después de lo cual se aislaron células de bazo para la producción de hibridoma. Las células de hibridoma se cultivaron en placas a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos, y el sobrenadante de cada pocillo se cribó mediante análisis ELISA y FACS contra la proteína antigénica. Se seleccionaron varios hibridomas con un título elevado de anticuerpos y escalaron en un cultivo en matraz estático. Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de hibridoma mediante cromatografía de proteína A o proteína G agarosa y los anticuerpos se analizaron mediante FACS tal como se describe a continuación. Se aislaron varios anticuerpos anti-NOTCH1 incluyendo 13M57 (también referido como 13M30) de animales inmunizados con el antígeno NOTCH1 correspondiente a repeticiones 1-5 de EGF y 31M80, 31M103, 31M106, y 31M108 de los animales inmunizados con el antígeno NOTCH1 correspondiente a las repeticiones 10-15 de EGF. Se determinaron las secuencias de nucleótidos y proteínas previstas de la cadena pesada (SEC ID N°: 4-5) y la cadena ligera (SEQ ID N°: 6-7) de anticuerpo 13M57. Se generó un anticuerpo de NOTCH2, 59M07, que se une específicamente a la repetición 2 de EGF.

Mapeo de epítomos

[0212] Para identificar anticuerpos que reconocen regiones de unión a no-ligando específicas de los dominios extracelulares del receptor Notch se realizó el mapeo de epítomos. En ciertas realizaciones, se generaron vectores plasmídicos de expresión de mamífero que comprenden un promotor de CMV en dirección 5' de polinucleótidos que codifican fragmentos del dominio extracelular NOTCH1 como proteínas de fusión de Fc utilizando la tecnología del ADN recombinante estándar. Estas proteínas de fusión incluían una serie de fragmentos de NOTCH1 que contienen una serie jerarquizada de delecciones de dominios EGF 1-5 ó 10-15. Las proteínas recombinantes se expresaron en células de mamífero cultivadas mediante transfección transitoria. Veinticuatro a 48 horas después de la transfección, las células se recogieron y la proteína de lisado celular se separó en geles de acrilamida SDS-PAGE no reductores para la transferencia Western utilizando anticuerpos de ratones inmunizados con el antígeno de NOTCH1. Tal como se muestra en la Figura 1A y B, el anticuerpo monoclonal 13M57 reconoció un epítomo

contenida en la repetición 4 de EGF (SEQ ID NO: 8) con una KD de 0,2 nM. El anticuerpo monoclonal 31M80 reconoció un epítipo en la repetición 13 de EGF (figura 1C). Los anticuerpos 31M103 (KD = 0,2 nM), 31M106 (KD = 3 nM), y 31M108 (KD = 0,2 nM) también reconocen un epítipo en EGF13 de Notch1. Todas las afinidades de anticuerpos se determinaron mediante BIAcore.

5 [0213] Para identificar epítopos específicos en los dominios extracelulares reconocidos por un anticuerpo contra NOTCH1 se utiliza el sistema de SPOT (Sigma Genosys, The Woodlands, TX). Se sintetiza una serie de péptidos lineales de 10 residuos que se solapan en un aminoácido y que cubre todo el dominio extracelular de NOTCH1 y se une covalentemente a una membrana de celulosa mediante la técnica de síntesis SPOT. La membrana se incubó previamente durante 8 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y se hibrida con el anticuerpo durante la noche a 4°C. La membrana se lava a continuación, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), se vuelve a lavar, y se visualiza con solución de desarrollo de señal que contiene 3-amino-9-etilcarbazol. De este modo, se determinan los epítopos específicos reconocidos por un anticuerpo.

15 Análisis FACS

[0214] Para seleccionar anticuerpos monoclonales producidos por clones de hibridoma que reconocen la proteína NOTCH1 de la superficie celular nativa, se utilizó un análisis FACS. Para facilitar el cribado de células mediante FACS, se conjugaron el anticuerpo IgG1 κ de ratón de control de isotipo y los clones del anticuerpo monoclonal anti-NOTCH1 13M57 y 31M80 a Alexa Fluor™ 647 (AF647) utilizando el kit de Invitrogen #A-20186. La reacción de conjugación dio lugar a aproximadamente 0,1 mL de anticuerpo anti-Notch1 marcado con AF647 a 1,0 mg/mL y anticuerpo de control de isotipo marcado con AF647 a aproximadamente 0,5 mg/mL. Se transfectoron de forma transitoria células HEK293 con vectores de expresión que codifican NOTCH1 y GFP de longitud completa. De veinticuatro a 48 horas después de la transfección se recogieron las células en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpo anti-NOTCH1 13M57, el correspondiente antisuero anti-NOTCH1 humano o anticuerpos IgG1 de control para detectar la unión de anticuerpo de base. Las células se lavaron y a continuación se clasificaron mediante FACS para identificar la unión del anticuerpo a NOTCH1 expresado en la superficie celular. El anticuerpo anti-NOTCH1 13M57 reconoce NOTCH1 de la superficie celular en células HEK 293 (figura 2A). De forma similar, el anticuerpo anti-NOTCH1 31M80 reconoce específicamente células HEK 293 transfectadas con receptor NOTCH1, pero no células no transfectadas, y esta unión se bloquea mediante cantidades crecientes de proteína antigénica que contiene repeticiones 10-16 de EGF de NOTCH unidas a Fc humana (Ag31), pero no proteína antigénica que contiene las repeticiones 1-5 de EGF unidas a Fc (Ag13) (figura 2B).

35 [0215] Para determinar si los anticuerpos anti-NOTCH1 reconocen la proteína receptora NOTCH1 en células tumorales, se analizaron células tumorales disociadas mediante FACS. Las células de tumores de mama disociadas se incubaron con anticuerpos anti-ESA, anti-CD44, y anti-NOTCH1. Los anticuerpos 13M57 y 31M80 mostraron una unión incrementada a células de dos tumores de mama diferentes (PE13 y T3) en comparación con un control de anticuerpo de isotipo (figura 2C, D). Además, estas células de tumores de mama expresaron niveles elevados de ESA y CD44 sugiriendo que ambos anticuerpos reconocen el receptor NOTCH1 en células madre de cáncer (figura 2C, D). El anticuerpo anti-receptor NOTCH1 31M80 también mostró una unión incrementada a células de tumores de colon disociadas de dos pacientes diferentes (figura 2E).

45 [0216] Para determinar si los niveles de expresión de NOTCH1 están directamente asociados con la actividad tumorigénica de células ESA+CD44+, se aislaron subpoblaciones de células PE13 mediante FACS en base a la tinción de 31M80-AF647 y CD44-PECy7 (Figura 2C). A continuación, las células aisladas se inyectan en ratones y se determina su tumorigenicidad, el número de células inyectadas requerido para la formación de tumores consistentes, en comparación con células tumores de ESA+CD44+NOTCH1 bajo y CD44-.

50 Anticuerpos quiméricos

[0217] Después de identificar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente un dominio de unión a no ligando de un receptor Notch, estos anticuerpos se modifican para superar la respuesta inmune del anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) cuando se utilizan anticuerpos de roedores como agentes terapéuticos. Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado se aíslan mediante RT-PCR a partir de células de hibridoma y se unen en el marco a las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera kappa de IgG1 humana, respectivamente, en vector de expresión de mamífero. Alternativamente, un vector de expresión de Ig humana, tal como TCAE 5.3, que contiene los genes de las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera kappa de IgG1 humana en el mismo plásmido (Preston et al., 1998, Infection & Immunity 66:4137-42). Los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera quiméricas se cotransfectan a continuación en células de ovario de hámster chino (CHO) para la producción de anticuerpos quiméricos. La inmunorreactividad y la afinidad de anticuerpos quiméricos se comparan con los anticuerpos murinos parentales por ELISA y FACS.

65 Anticuerpos humanizados

[0218] Como los agentes terapéuticos de anticuerpos quiméricos son todavía con frecuencia antigénicos, en la producción de respuesta inmune de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), los anticuerpos quiméricos contra un receptor NOTCH1 puede requerir una humanización adicional. Para generar anticuerpos humanizados, se diseñan las tres secuencias cortas hipervariables, o regiones determinantes de complementariedad (CDR), de los dominios de cadena pesada y ligera del anticuerpo quimérico descritas anteriormente utilizando la tecnología de ADN recombinante en la región estructural de dominio variable de secuencias de cadena pesada y ligera humanas, respectivamente, y a continuación se clona en un vector de expresión de mamífero para la expresión en células CHO. La inmunorreactividad y la afinidad de los anticuerpos humanizados se comparan con anticuerpos quiméricos parentales por ELISA y FACS. Adicionalmente, se puede utilizar mutagénesis dirigida de sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc del anticuerpo humanizado.

Anticuerpos humanos

[0219] En realizaciones alternativas, los anticuerpos humanos que reconocen específicamente el dominio extracelular de no-ligando de un receptor NOTCH se aíslan usando la tecnología de expresión en fagos. Se criba una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos (MorphoSys, Múnich, Alemania) para el reconocimiento específico y de la alta afinidad de un antígeno de receptor NOTCH descrito anteriormente. Los cassettes de CDR en la biblioteca se intercambian específicamente a través de sitios de restricción únicos flanqueantes para la optimización de anticuerpos. A continuación, se clonan las regiones variables humanas optimizadas en un vector de expresión de Ig que contiene cadena pesada y cadena ligera kappa de IgG1 humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.

Ejemplo 2

Ensayos in vitro para evaluar anticuerpos contra un receptor NOTCH1

[0220] Este ejemplo describe métodos para ensayos in vitro para analizar la actividad de anticuerpos generados contra un receptor NOTCH1 en la proliferación y citotoxicidad celular.

Unión a ligando

[0221] Los anticuerpos contra NOTCH1 se analizaron por su capacidad de bloquear la unión a ligando de los ligandos de los receptores NOTCH DLL4 y JAGGED1 (JAG1). Las células HEK 293 transfectadas de manera estable con un ADNc de NOTCH1 de longitud completa se incubaron con DLL4-Fc o JAG1-Fc en presencia de anticuerpos anti-NOTCH1 (13M57, 31M103, 31M106, ó 31M108) o anticuerpos de control anti-DLL4 (21M18) o anti-JAG1 (64M14). La unión de las proteínas de fusión de Fc a células que expresan NOTCH1 se detectó mediante anticuerpo anti-Fc de cabra conjugado a PE y citometría de flujo.

[0222] Los anticuerpos anti-NOTCH1 contra EGF13 no logran bloquear eficazmente la unión a ligando (Figura 3). La inhibición de anticuerpos anti-DLL4 o anti-JAG1 de la unión de DLL4 o JAG1 al receptor NOTCH1, respectivamente, se comparó con la inhibición por anticuerpos anti-NOTCH1. Los anticuerpos anti-NOTCH1 31M103, 31M106, y 31M108, los cuales se unen específicamente a EGF13, inhiben sólo parcialmente la unión a ligando. 31M108 mostró inhibición entre 50-75% en comparación con los anticuerpos de ligando. Del mismo modo, 31M103 y 31M106 y mostraron una inhibición de sólo entre 25-50%.

[0223] Los anticuerpos anti-NOTCH1 contra EGF4 no bloquean la unión a ligando (Figura 3). De nuevo, la inhibición del anticuerpo anti-DLL4 o anti-JAG1 de la unión de DLL4 o JAG1 a NOTCH1 se comparó con la inhibición por los anticuerpos anti-NOTCH1 13M57, que se unen específicamente a EGF4. Los 13M57 no mostraron inhibición de la unión a ligando cuando se comparaba con la inhibición por anticuerpos anti-DLL4 o anti-JAG1.

Ensayo de proliferación

[0224] Los anticuerpos contra NOTCH1 se ensayaron para determinar su efecto sobre el crecimiento de células tumorales in vitro utilizando un ensayo basado en BrdU. Se cultivaron células de tumor de mama recién disociadas, agotadas en Lin, en bajos niveles de oxígeno durante 2-5 días. Las células se cultivaron a continuación a 20.000 células/pocillo con 2,5 ug/ml ó 5,0 ug/ml de anti-NOTCH1 (13M57), IgG murina no específica de control o sin anticuerpo durante tres días, seguido de 18 horas de marcaje con BrdU. Todos los experimentos se realizaron con 5 repeticiones. La capacidad de los anticuerpos anti-NOTCH1 para inhibir la proliferación celular en comparación con anticuerpos de control se muestra en la Figura 4.

Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento

[0225] Se utilizan líneas celulares de cáncer que expresan un receptor NOTCH1 o, de forma alternativa, células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente pasada como xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (que se describe en detalle a continuación) para medir la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediada por un anticuerpo contra un receptor NOTCH1. Las células se suspenden en 200 ul de medio de cultivo RPMI 1640

suplementado con antibióticos y FBS al 5% a 10^6 células/ml. Las células suspendidas se mezclan a continuación con 200 ul de suero o suero inactivado por calor con anticuerpos contra un receptor NOTCH1 o anticuerpos de control por triplicado. Se incuban mezclas de células durante 1 a 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%. A continuación, se recogen las células tratadas, se resuspenden en 100 ul de anexina V marcada con FITC diluida en medio de cultivo y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. Se añaden cien ul de una solución de yoduro de propidio (25 ug/ml) diluida en HBSS y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Se recogen las células, se resuspenden en medio de cultivo y se analizan por citometría de flujo. La citometría de flujo de células teñidas con FITC proporciona recuentos de células totales, y se utiliza la captación de yoduro de propidio por células muertas como porcentaje del número total de células para medir la muerte celular en presencia de suero y de anticuerpos contra NOTCH1 en comparación con suero inactivado por calor y anticuerpos de control. Se determina así la capacidad de los anticuerpos anti-NOTCH1 a la citotoxicidad mediada dependiente de complemento.

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

[0226] Se utilizan líneas celulares de cáncer que expresan un receptor NOTCH1 o, alternativamente, células madre de cáncer aisladas de una muestra de pacientes pasada como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (descrito en detalle a continuación) para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por un anticuerpo contra un receptor NOTCH1. Las células se suspenden en 200 ul de medio de cultivo RPMI 1640 libre de rojo de fenol suplementado con antibióticos y FBS al 5% a 10^6 células/ml. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de sangre periférica heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque para su uso como células efectoras. Las células diana (T) se mezclan a continuación con células efectoras PBMC (E) en proporciones E/T de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 pocillos en presencia de un receptor NOTCH1 o anticuerpos de control. Los controles incluyen la incubación de células diana solas y células efectoras solas en presencia de anticuerpo. Las mezclas de células se incuban durante 1 a 6 horas a 37°C en 5% de CO₂. La lactato deshidrogenasa (LDH) liberada, una enzima citosólica estable liberada tras la lisis celular, se mide a continuación mediante un ensayo colorimétrico (Ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox96; Promega, Madison, WI). Se recogen los datos de absorbancia a 490 nm con un lector estándar de placas de 96 pocillos y se corrige el ruido de fondo. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula según la fórmula: % de citotoxicidad = $100 \times (\text{liberación de LDH experimental} - \text{liberación de LDH espontánea efectora} - \text{liberación de LDH espontánea diana}) / (\text{liberación de LDH máxima diana} - \text{liberación de LDH espontánea diana})$. De este modo, se determina la capacidad de anticuerpos contra un receptor NOTCH1 a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada.

Ejemplo 3

Prevención in vivo de crecimiento tumoral utilizando anticuerpos anti-receptor NOTCH de la región de unión a no-ligando

[0227] Este ejemplo describe la utilización de anticuerpos anti-receptor NOTCH1 y anti-receptor NOTCH2 contra una región de unión a no ligando para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto.

[0228] Se prepararon para inyección en animales experimentales células tumorales de una muestra de paciente UM-PE13, OMP-C9, OMP-C8, y OMP-C6 que han pasado como un xenoinjerto en ratones. Se extrajo tejido tumoral bajo condiciones estériles, se cortó en pequeños trozos, se desmenuzó completamente utilizando cuchillas estériles y se obtuvieron suspensiones de células individuales mediante digestión enzimática y rotura mecánica. Los trozos de tumor resultantes se mezclaron con colagenasa III ultrapura en medio de cultivo (200-250 unidades de colagenasa por ml) y se incubaron a 37°C durante 3-4 horas con pipeteo mediante una pipeta de 10 ml cada 15-20 min. Las células digeridas se filtraron a través de una malla de nylon de 45 ul, se lavaron con RPMI/FBS al 20% y se lavaron dos veces con HBSS. A continuación, las células tumorales disociadas se inyectaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID a las 6-8 semanas para producir el crecimiento tumoral. Para células tumorales de mama UM-PE13, se inyectaron 50.000 células en 100 ul en la almohadilla de grasa mamaria derecha (n=20) junto con el implante de un pélet de estrógeno. Para células tumorales de colon OMP-C9, se inyectaron 50.000 células en 100 ul en la región del flanco derecho (n=20). Para células tumorales de colon OMP-C8, se inyectaron 10.000 células en 100 ul en el área del flanco derecho (n=10). Para células tumorales de colon OMP-C6, se inyectaron 10.000 células en 100 ul en el flanco derecho (n=10).

[0229] En realizaciones alternativas, las células tumorales disociadas se clasifican primero en células tumorigénicas y no tumorigénicas en base a marcadores de la superficie celular antes de la inyección en animales experimentales. Específicamente, las células tumorales disociadas tal como se ha descrito anteriormente se lavan dos veces con solución salina tamponada con Hepes (HBSS) que contienen suero de ternera desactivada por el calor al 2% (HICS) y se resuspenden a 10^6 células por 100 ul. Se añaden anticuerpos y las células se incuban durante 20 minutos en hielo, seguido mediante dos lavados con HBSS/HICS al 2%. Los anticuerpos incluyen marcadores anti-ESA (Biomedica, Foster City, CA), anti-CD44, anti-CD24, y de linaje anti-CD2, -CD3, -CD10, -CD16, -CD18, -CD31, -CD64, y -CD140b (referidos colectivamente como Lin; PharMingen, San Jose, CA). Los anticuerpos se conjugan directamente a fluorocromos a células seleccionadas positivamente o negativamente que expresan estos marcadores. Las células de ratón se eliminan mediante la selección contra células H2Kd+, y las células muertas se eliminan mediante la utilización del colorante de viabilidad 7AAD. Se realiza citometría de flujo en un FACSVantage

(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se utilizan perfiles de dispersión lateral y frontal para eliminar grupos de células. A continuación, se inyectan células tumorigénicas aisladas con Lin, ESA+, CD44+, CD24-/bajo subcutáneamente en ratones NOD/SCID para producir el crecimiento tumoral.

5 [0230] Tres días después de la inyección de células tumorales, se comenzó el tratamiento con anticuerpos. Cada animal inyectado recibió 10 mg/kd de anticuerpos anti-NOTCH1 o PBS como control intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana para un total de 6 a 8 semanas. Los animales inyectados con células UM-PE13 recibieron inyecciones en la almohadilla de grasa mamaria superior derecha además de las inyecciones de pélets de estrógeno. Los animales inyectados con células OMP-C9, OMP-C8, o UM-C6 recibieron inyecciones en el cuadrante inferior derecho del abdomen. Se evaluó el tamaño del tumor dos veces por semana. Los animales tratados con anticuerpos 10 13M57 anti-NOTCH1 presentaron un crecimiento de células tumorales de mama PE-13 significativamente reducido (figura 5) y un crecimiento de células tumorales de colon OMP-C9 significativamente reducido (figura 6A) en comparación con controles inyectados con PBS. Los animales tratados con anticuerpos anti-NOTCH1 13M57, 31M103, o 31M106 presentaban un crecimiento de células tumorales de colon OMP-C8 significativamente reducido (figura 6B) en comparación con los controles. Una experimentación adicional ha indicado cierta variabilidad en el efecto de los anticuerpos 13M57 anti-NOTCH1 en la reducción del crecimiento de células tumorales OMP-C9 en ratones NOD/SCID.

20 [0231] La inyección de células PE-13 que expresan luciferasa bajo el control de un promotor constituyó fuerte permite la detección sensible y precisa in vivo del crecimiento tumoral durante la evolución del tratamiento. Los animales se inyectan con luciferina, que se convierte por la enzima luciferasa para producir luz que se puede ver como imagen a través de la piel. El tratamiento con anticuerpos 13M30 (13M57) redujo significativamente el crecimiento de células tumorales PE-13 que expresan luciferasa en comparación con el tratamiento con PBS o anticuerpos de control (Figura 7).

25 [0232] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-NOTCH2 59M07 se administró a 10 mg/kg 2 días después de la inyección de células tumorales C6. El anticuerpo se administró dos veces por semana durante un total de 48 días. El tratamiento con 59M07 redujo significativamente el crecimiento de células tumorales de colon (figura 8).

30 Ejemplo 4

Producción de anticuerpos contra la repetición 4 de EGF de NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4

35 [0233] La identificación de un anticuerpo contra la cuarta repetición de EGF de NOTCH1 que reduce el crecimiento tumoral en animales sugiere la importancia del dominio de no ligando y la cuarta repetición de EGF en particular, para terapias efectivas contra el cáncer. Para reconocer la repetición 4 de EGF en otros miembros de la familia de receptores Notch, los anticuerpos contra la repetición 4 de EGF de NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4 se producen y analizan tal como se ha descrito anteriormente para anti-NOTCH1 13M57. Específicamente, los ratones se inmunizan con antígenos que comprenden la cuarta repetición de EGF de NOTCH2 (SEQ ID NO: 9); NOTCH3 (SEQ ID NO: 10), o NOTCH4 (SEQ ID NO: 11). Los anticuerpos que reconocen receptores Notch específicos, así como reconocen diferentes combinaciones de los cuatro receptores Notch, se identifican utilizando análisis FACS de células HEK 293 transfectadas con cada receptor Notch tal como se ha descrito anteriormente. Se prevén anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de dos miembros de la familia de receptores Notch (por ejemplo, anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de NOTCH1 y NOTCH2; NOTCH1 y NOTCH3; NOTCH1 y NOTCH4; NOTCH2 y NOTCH3; NOTCH2 y NOTCH4; o NOTCH3 y NOTCH4). Se prevén anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de tres miembros de la familia de receptores Notch (por ejemplo, anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de NOTCH1, NOTCH2, y NOTCH3; NOTCH1, NOTCH2, y NOTCH4; o NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4). Y se prevén anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de cuatro miembros de la familia de receptores Notch (por ejemplo, anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 y NOTCH4).

50 Ejemplo 5

Tratamiento in vivo de tumores utilizando anticuerpos anti-receptor NOTCH1

55 [0234] Este ejemplo describe la utilización de anticuerpos anti-receptor NOTCH1 para tratar el cáncer en un modelo de xenoinjerto.

60 [0235] Se preparan células tumorales de una muestra del paciente (biopsia de tumor sólido o derrame pleural) que se han pasado como un xenoinjerto en ratones para volver a pasar en animales de experimentación. Se extirpa el tejido tumoral, se corta en trozos pequeños, se desmenuza completamente utilizando cuchillas estériles, y se obtienen suspensiones de células individuales por digestión enzimática y ruptura mecánica. A continuación, se inyectan subcutáneamente las células tumorales disociadas en las almohadillas de grasa mamaria, para tumores de mama, o en el flanco, para tumores no de mama, de ratones NOD/SCID para producir el crecimiento del tumor. Alternativamente se aíslan células tumorales tumorigénicas con Lin, ESA+, CD44+, CD24-/bajo, tal como se ha descrito en detalle anteriormente, y se inyectan.

[0236] Después de la inyección de células tumorales, los animales se monitorizan para el crecimiento tumoral. Una vez que los tumores alcanzan un tamaño medio de aproximadamente 150 a 200 mm, se inicia el tratamiento con anticuerpos. Cada animal recibe 100 ug anticuerpos del receptor NOTCH1 o anticuerpos de control ip dos a cinco veces por semana durante un total de 6 semanas. El tamaño del tumor se evaluó dos veces a la semana durante estas 6 semanas. Se determina de este modo la capacidad de anticuerpos del receptor NOTCH1 para evitar aún más el crecimiento del tumor o para reducir el tamaño del tumor en comparación con anticuerpos de control.

[0237] En el punto final del tratamiento con anticuerpos, se recogieron los tumores para un análisis posterior. En algunas realizaciones, se analiza una parte del tumor mediante inmunofluorescencia para evaluar la penetración del anticuerpo en el tumor y la respuesta del tumor. Una parte de cada tumor recogido de ratones tratados con anticuerpo anti-receptor NOTCH1 y anticuerpo de control se congela en fresco en nitrógeno líquido, se embebe en O.C.T. y se corta en un criostato como secciones de 10 um sobre portaobjetos de vidrio. Alternativamente, una parte de cada tumor se fija en formalina, se embebe en parafina, y se corta en un microtomo como una sección de 10 um sobre portaobjetos de vidrio. Las secciones se fijan posteriormente y se incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen específicamente anticuerpos inyectados para detectar anticuerpos anti-receptor NOTCH1 o de control presentes en la biopsia de tumor. Además, se pueden utilizar anticuerpos que detectan diferentes tipos de tumores y de células reclutadas de tumores, tales como, por ejemplo, anticuerpos anti-VE cadherina (CD144) o anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células endoteliales vasculares, anticuerpos anti-alfa actina de músculo liso para detectar células de músculo liso vascular, anticuerpos anti-Ki67 para detectar células proliferativas, ensayos TUNEL para detectar células que mueren, y anticuerpos anti-fragmento de Notch de dominio intracelular (ICD) para detectar la señalización de Notch para evaluar los efectos del tratamiento con anticuerpos en la angiogénesis, crecimiento tumoral y morfología tumoral.

[0238] También se evalúa el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-receptor NOTCH1 en la expresión génica de células tumorales. El ARN total se extrae a partir de una parte de cada tumor recogido de ratones tratados con anticuerpo de NOTCH1 y tratados con anticuerpo de control y se utiliza para la RT-PCR cuantitativa. Se analizan los niveles de expresión de NOTCH1, componentes del mecanismo de señalización de Notch que incluyen, marcadores adicionales de células madre de cáncer identificados previamente que incluyen, por ejemplo, CD44, en relación con la GAPDH de genes constitutivos como control interno. De este modo, se determinan los cambios en la expresión génica de células tumorales tras el tratamiento con anticuerpos de receptor NOTCH1.

[0239] Además, se evaluó el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-receptor NOTCH1 en presencia de células madre de cáncer en un tumor. Las muestras tumorales de ratones tratados con NOTCH1 versus anticuerpos de control se cortan en trozos pequeños, se desmenuzan completamente utilizando cuchillas estériles, y se obtienen suspensiones de células individuales por digestión enzimática y ruptura mecánica. A continuación, se analizan células tumorales disociadas mediante análisis FACS para la presencia de células madre de cáncer tumorigénicas en base a la expresión de marcadores ESA+, CD44 +, CD24-/bajo, célula de la superficie Lin tal como se ha descrito en detalle anteriormente.

[0240] Se puede evaluar la tumorigenicidad de células aisladas en base a ESA+, CD44+, CD24-/bajo, expresión de Lin después del tratamiento con anticuerpos. Se reinyectan subcutáneamente 5.000, 1.000, 500 y 100 células madre de cáncer de Lin con ESA+, CD44+, CD24-/bajo aisladas de ratones tratados con anticuerpo NOTCH1 frente a ratones tratados con anticuerpo de control en las almohadillas de grasa mamaria de ratones NOD/SCID. Se determina de este modo la tumorigenicidad de las células madre de cáncer en base al número de células inyectadas necesarias para la formación de tumores consistentes.

Ejemplo 6

Tratamiento in vivo de tumores utilizando terapia de combinación: anticuerpos anti-receptor NOTCH1 y quimioterapia

[0241] Este ejemplo describe métodos de tratamiento del cáncer utilizando terapia de combinación. Específicamente, se utilizaron anticuerpos anti-NOTCH1 en combinación con quimioterapia para tratar el crecimiento de tumores iniciales y establecidos en un modelo de xenoinjerto.

[0242] En ciertas realizaciones, se trataron células de tumores de mama con una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y el agente quimioterapéutico, paclitaxel. Las células tumorales de una muestra de paciente UM-PE13 que han pasado como un xenoinjerto en ratones se prepararon para la inyección en animales experimentales tal como se ha descrito anteriormente. Se inyectaron subcutáneamente células tumorales UM-PE13 disociadas (50.000 por animal) en la almohadilla de grasa mamaria derecha de ratones NOD/SCID junto con el implante de un pélet de estrógeno. Se dejaron crecer los tumores durante veinticuatro días, después de los cuales se midieron los tumores y los animales se separaron en cuatro grupos (n=10), cada uno con un volumen promedio de tumor de 130 mm³. Cada uno de los cuatro grupos se trató de la siguiente manera durante 4 semanas: Grupo 1: paclitaxel; Grupo 2: paclitaxel; Group 3 paclitaxel + 13M57; y grupo 4: paclitaxel + 13M57. Todas las inyecciones se administraron IP, 2 veces por semana. El paclitaxel se dosificó a 15 mg/kg y el 13M57 se dosificó a 30 mg/kg. Los tratamientos con paclitaxel o

paclitaxel + 13M57 se detuvieron en el día 52 después de que los tumores hubieran experimentado una regresión y eran indetectables. A continuación, los animales se trataron de la siguiente manera: grupo 1: PBS; Grupo 2: 13M57; Grupo 3: PBS; y Grupo 4: 13M57. El volumen del tumor se comprobó una vez por semana durante el resto del experimento.

5 [0243] Tal como se muestra en la figura 9, el tratamiento de combinación simultánea (paclitaxel + 13M57) seguido del tratamiento continuo con anticuerpos 13M57 anti-NOTCH1 presentaba el mayor efecto en la reaparición del tumor. Específicamente, los animales del grupo 4 que se trataron con una combinación de paclitaxel y 13M57 durante cuatro semanas seguido del tratamiento continuo con 13M57 solo mostraron un recrecimiento mínimo del tumor cuarenta días después de la terminación del tratamiento con paclitaxel (figura 9A). Sólo un animal en el grupo 4 mostró un recrecimiento apreciable del tumor (figura 9B). De manera similar, el tratamiento de combinación en que el tratamiento con paclitaxel se administró antes del tratamiento con 13M57 (grupo 2) también mostró una reducción significativa en el recrecimiento del tumor en comparación con animales tratados con paclitaxel solo (grupo 1), éste último mostró una reaparición del tumor que alcanzó volúmenes del tumor próximos a 100 mm³. Y finalmente, la terapia de combinación sin tratamiento continuado con anticuerpos 13;57 anti-Notch (grupo 3) también mostró una eficacia significativa en la reducción del recrecimiento del tumor en comparación con el tratamiento de paclitaxel solo (figura 9).

20 [0244] En ciertas realizaciones, las células de tumor de colon se trataron con una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y el agente quimioterapéutico, irinotecán. Las células tumorales de la muestra de paciente OMP-C8 pasadas como un xenoinjerto en ratones se prepararon para la inyección en animales experimentales tal como se describe anteriormente. Las células OMP-C8 disociadas (20.000 células por animal) se inyectaron en ratones NOD/SCID en el cuadrante inferior derecho del abdomen. 2 días después de la inyección celular, los animales se trataron con 7,5 mg/kg de irinotecán solo (n = 10) o con 10 mg/kg del anticuerpo anti-NOTCH1 13M57 más 7,5 mg/kg de irinotecán (n = 10). Los animales recibieron un tratamiento de dos veces por semana hasta 56 días y se evaluó el volumen del tumor dos veces por semana.

30 [0245] Tal como se muestra en la figura 10, el tratamiento de combinación simultánea de irinotecán más 13M57 evitó el crecimiento del tumor de colon durante el tratamiento y también mantuvo las células tumorales en este estado no proliferativo hasta treinta días después del cese del tratamiento. Casi todos los animales tratados con irinotecán solo mostraron el crecimiento de tumores durante la fase de tratamiento, después de lo cual los tumores continuaron creciendo hasta la terminación del experimento (figura 10A). En cambio, los animales tratados con 13M57 más irinotecán mostraron un crecimiento nulo a escaso durante el tratamiento de combinación (figura 10B). Además, las células tumorales permanecieron inactivas después del tratamiento, con sólo dos animales mostrando un crecimiento tumoral de casi treinta días (figura 10B).

40 [0246] En ciertas realizaciones, las células de tumor de colon se trataron con una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y el agente quimioterapéutico, oxaliplatino. Las células tumorales de la muestra de paciente OMP-C8 se prepararon para la inyección en animales experimentales tal como se ha descrito anteriormente. Las células OMP-C8 disociadas (20.000 células por animal) se inyectaron en ratones NOD/SCID en el cuadrante inferior derecho del abdomen y se dejaron crecer hasta alcanzar un volumen promedio de tumor de 200 mm³. Los animales (n = 10 por grupo experimental) se trataron con oxaliplatino (7,5 mg/kg), 10 mg/kg de 13M57, una combinación de oxaliplatino y 13M57, o un anticuerpo de control. El tratamiento se administró dos veces por semana durante 22 días; el volumen del tumor se evaluó dos veces por semana.

45 [0247] Tal como se muestra en la figura 11, el tratamiento de combinación fue más efectivo en la inhibición del crecimiento de tumores establecidos que el tratamiento con oxaliplatino o 13M57 solos. El tratamiento con anti-NOTCH1/13M57 u oxaliplatino redujo significativamente el crecimiento del tumor ($p = 0,04$ vs. control), pero el tratamiento de combinación redujo adicionalmente el crecimiento en comparación con el tratamiento con el agente solo ($p = 0,03$ vs. agente solo) (Figura 11).

Ejemplo 7

55 Tratamiento in vivo de tumores utilizando terapia de combinación: anticuerpos anti-receptor NOTCH1 y anti-receptor NOTCH2

[0248] Este ejemplo describe métodos de tratamiento del cáncer utilizando terapia de anticuerpos de combinación. En ciertas realizaciones, las células de tumores de mama se trataron con una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y anti-NOTCH2. Se prepararon células tumorales de la muestra de paciente UM-PE13 que expresa luciferasa bajo el control de un promotor fuerte constitutivo para la inyección en animales experimentales tal como se ha descrito anteriormente. Las células tumorales PE13 disociadas (50,000 por animal) se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla de grasa mamaria derecha de ratones NOD/SCID junto con un pélet de estrógeno. Dos días después de la inyección de células, los animales se trataron con 10 mg/kg anti-NOTCH1 31M108, 10 mg/kg 59M07 anti-NOTCH2, una combinación de anticuerpos anti-NOTCH1 y NOTCH2, o un anticuerpo de control (n = 8-10 para cada grupo experimental). Antes de obtener imágenes por bioluminiscencia, los animales se inyectaron con luciferina; la luciferina se convierte mediante la enzima de la luciferasa en luz que se puede

transformar en imágenes a través de la piel. Los animales se transformaron en imágenes y se evaluó el volumen tumoral dos veces por semana.

[0249] Tal como se muestra en la Figura 12, el tratamiento con una combinación de anticuerpos de receptor NOTCH tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de células tumorales de mama. El tratamiento con anticuerpos 13M108 o 59M07 solos mostró sólo una ligera reducción en el crecimiento del tumor de mama (Figura 12A). En cambio, el tratamiento de combinación con anticuerpos anti-NOTCH1 y anti-NOTCH2 redujo significativamente el crecimiento de células tumorales PE13 que expresan luciferasa (Figura 12A). La determinación del volumen total del tumor mostró una reducción similar en células tumorales de mama PE13 (Figura 12B). Los animales tratados con anticuerpos 31M108 mostraron una reducción significativa en el volumen total del tumor en comparación con los animales tratados de control ($p < 0,05$). Se observó una reducción adicional en los animales tratados con la combinación de anticuerpos: el tratamiento con anticuerpos NOTCH1 y NOTCH2 redujo el crecimiento tumoral de forma significativa en comparación con el tratamiento con cualquier anticuerpo solo ($p < 0,05$) (Figura 12B).

Ejemplo 8

Tratamiento de cáncer humano utilizando anticuerpo anti-receptor NOTCH1

[0250] Este ejemplo describe métodos para tratar el cáncer utilizando anticuerpos contra un receptor NOTCH1 para reconocer tumores que comprenden células madre de cáncer y/o células tumorales en que se ha detectado la expresión del receptor NOTCH1.

[0251] La presencia de la expresión de marcadores de células madre de cáncer se puede determinar primero a partir de una biopsia de tumor. Se extraen bajo condiciones estériles células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer. En algunas realizaciones, la biopsia de tejidos se congela en fresco en nitrógeno líquido, se embebe en O.C.T. y se corta en un criostato como secciones de 10 μ m sobre portaobjetos de vidrio. Las secciones se incuban con anticuerpos contra un receptor NOTCH1 para detectar la expresión de proteína. Adicionalmente, se puede determinar la presencia de células madre de cáncer. Las muestras de biopsia de tejido se cortan en piezas pequeñas, se desmenuzan completamente utilizando cuchillas estériles y las células se someten a digestión enzimática y ruptura mecánica para obtener una suspensión de células individuales. A continuación, las células tumorales disociadas se incuban con anticuerpos anti-ESA, -CD44, -CD24, -Lin, y -NOTCH1 para detectar células madre de cáncer y se determina la presencia de células madre de tumor con ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, NOTCH1+ mediante citometría de flujo tal como se describe en detalle anteriormente.

[0252] Los pacientes de cáncer con tumores que se diagnostican como que expresan un receptor NOTCH1 se tratan con anticuerpos anti-receptor NOTCH1. Los anticuerpos anti-receptor NOTCH1 monoclonales humanizados o humanos generados tal como se describe anteriormente se purifican y formulan con un vehículo farmacéutico adecuado en PBS para inyección. Los pacientes son tratados con los anticuerpos NOTCH1 una vez a la semana durante al menos 10 semanas, pero en ciertos casos una vez a la semana durante al menos aproximadamente 14 semanas. Cada administración del anticuerpo debe ser una dosis farmacéuticamente eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml y en algunos casos entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml. El anticuerpo se puede administrar antes de, simultáneamente con, o después de pautas de radioterapia estándar o pautas de quimioterapia utilizando uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como oxaliplatino, fluorouracilo, leucovorina, o estreptozocina. Los pacientes se monitorizan para determinar si dicho tratamiento ha dado lugar a una respuesta anti-tumoral, por ejemplo, en base a la regresión del tumor, la reducción en las incidencias de nuevos tumores, menor expresión de antígenos del tumor, disminución del número de células madre de cáncer, u otros medios de evaluación del pronóstico de la enfermedad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0253]

<110> Oncomed Pharmaceuticals, Inc.
Gurney, Austin
Lewicki, John A.

Yen, Jean
Hoey, Timothy
Satyal, Sanjeev

<120> Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer

<130> 2293.022PC03/KWM/PAC

<140> A asignar
<141> con la presente
<150> 60/879,336
<151> 2007-01-09
<150> 60/878,661
<151> 2007-01-05
<150> 60/812,955

ES 2 413 087 T3

<151> 2006-06-13

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

5 <211> 660

<212> ADN

<213> Polinucleótido de NOTCH1 para las repeticiones 1-5 de EGF

<400> 1

10 atgccgcgcg tccctggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga 60
ggcccgcgat gctcccagcc cggtgagacc tgccctgaatg gcgggaagtg tgaagcggcc 120
15 aatggcacgg aggcctgcgt ctgtggcggg gccttcgtgg gcccgcgatg ccaggacccc 180
aaccctgccc tcagcacccc ctgcaagaac gccgggacat gccacgtggt ggaccgcaga 240
ggcgtggcag actatgcctg cagctgtgcc ctgggcttct ctgggcccct ctgcctgaca 300
20 cccctggaca atgcctgcct caccaacccc tgccgcaacg ggggcacctg cgacctgctc 360
acgctgacgg agtacaagtg ccgctgcccg cccggctggt cagggaaatc gtgccagcag 420
gctgaccggt gcgcctccaa cccctgcgcc aacggtggcc agtgcctgcc cttcgaggcc 480
25 tectacatct gccactgccc acccagcttc catggcccca cctgccggca ggatgtcaac 540
gagtgtggcc agaagcccgg gctttgccgc cacggaggca cctgccacaa cgaggtcggc 600
30 tectaccgct gcgtctgccc cgccaccac actggcccca actgcgagcg gccctacgtg 660

35

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

40 <213> Polipéptido de NOTCH1 para las repeticiones 1-5 de EGF

<400> 2

45

1 Met Pro Pro Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Ala Leu Leu Pro Ala
 5 Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu
 10 Asn Gly Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
 15 Gly Gly Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu
 20 Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg
 25 Gly Val Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro
 30 Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg
 35 Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
 40 Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
 45 Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala
 50 Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
 55 Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
 60 Gly Thr Cys His Asn Glu Val Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Arg Ala
 65 Thr His Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val

<210> 3

<211> 202

<212> PRT

5 <213> Polipéptido de NOTCH1 después de la posible escisión de la secuencia señal

<400> 3

```

10      Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu Asn Gly
        1              5              10              15

15      Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys Gly Gly
        20              25              30

20      Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu Ser Thr
        35              40              45

25      Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg Gly Val
        50              55              60

30      Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro Leu Cys
        65              70              75              80

35      Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg Asn Gly
        85              90              95

40      Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg Cys Pro
        100             105             110

45      Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys Ala Ser
        115             120             125

50      Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala Ser Tyr
        130             135             140

55      Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg Gln Asp
        145             150             155             160

60      Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly Gly Thr
        165             170             175

        Cys His Asn Glu Val Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Arg Ala Thr His
        180             185             190

        Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val
        195             200
    
```

<210> 4

<211> 1383

<212> ADN

65 <213> Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 13M57 anti-NOTCH1

ES 2 413 087 T3

<400> 4

	atgaacttcg ggctcagett ggttttcctt gtccttattt taaaggggtg cctgtgtgag	60
5	gtgaacctgg tggagtctgg gggagattta gtgcagcctg gaggggccct gagactctcc	120
	tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatactatgt cttgggttcg ccagactcca	180
	gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt gattatgggt gtgatttcac ctccattca	240
10	gacgctataa ggggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
	caaatgagca gtctgaagtc tgaggacacg gccatttatt actgttcaag acggaggtag	360
	gatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcatcg tctcttcagc caaaacgaca	420
15	cccccatctg tctatccact ggccccgga tctgctgcc aaactaactc catgggtgacc	480
	ctgggatgcc tggtaaggg ctatttcctt gagccagtga cagtgcctg gaactctgga	540
20	tcctgtcca ggggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg	600
	agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt	660
	gcccacccgg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccagga ttgtggtgt	720
25	aagccttgca tatgtacagt ccagaaagta tcatctgtct tcattctccc cccaaagccc	780
	aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct aaggtcacgt gtgttggtgt agacatcagc	840
	aaggatgatc ccgaggtcca gttcagctgg tttgtagatg atgtggaggt gcacacagct	900
30	cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac agcactttcc gctcagtcag tgaacttccc	960
	atcatgcacc aggactggct caatggcaag gaggttcaat gcaggggtcaa cagtgcagct	1020
35	ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gcagaccgaa ggctccacag	1080
	gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc	1140
	atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtgga tgggcagcca	1200
40	gcgagagaact acaagaacac tcagcccatc atggacacag atggctctta ctctgtctac	1260
	agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa atactttcac ctgctctgtg	1320
	ttacatgagg gctgcacaa ccaccatact gagaagagcc tctcccactc tcctggtaaa	1380
45	tga	1383

<210> 5

<211> 460

50 <212> PRT

<213> Secuencia de proteína prevista de cadena pesada IgG1 de anticuerpo monoclonal 13M57 anti-NOTCH1

<400> 5

55

60

65

5 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

10 Val Leu Cys Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln
20 25 30

15 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

20 Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

25 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Tyr Gly Gly Asp Phe Thr Ser Tyr Ser
65 70 75 80

30 Asp Ala Ile Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

35 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile
100 105 110

40 Tyr Tyr Cys Ser Arg Arg Arg Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

45 Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
130 135 140

50 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
145 150 155 160

55 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
165 170 175

60 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

65 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

70 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
210 215 220

75 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
225 230 235 240

80 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe

ES 2 413 087 T3

atggtgtcct cagctcagtt ccttgggtctc ctggttgcct gttttcaagg taccagatgt 60
 5 gatatccaga tgacacagag tacctcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120
 gtcagttgca gtgcaagtca ggccattagc aattatttaa actgggtatca gcagaaacca 180
 gatggaactc ttaaactcct gatctattat acaacaaatt tacactcagg agtcccatca 240
 10 aggttcagtg gcagtggggc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 300
 gaagacattg ccacttacta ttgtcaacaa tatagtaagt ttccgtggac gttcgggtgga 360
 15 ggcaccaagt tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 20 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 25 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705

<210> 7

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia de proteína prevista de la cadena ligera kappa del anticuerpo monoclonal 13M57 anti-NOTCH1

<400> 7

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

60

65

5 Lys Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140

10 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

15 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175

20 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205

25 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

30 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

35 <210> 8
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> repetición 4 de EGF de NOTCH1
 <400> 8

40

45 Gln Ala Asp Pro Cys Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys
 1 5 10 15

Leu Pro Phe Glu Ala Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His
 20 25 30

50 Gly Pro Thr Cys Arg Gln
 35

55 <210> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> repetición 4 de EGF de NOTCH2
 <400> 9

60 Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Ala Asn Gly Ser Thr Cys Thr
 1 5 10 15

65

Thr Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Lys Cys Leu Thr Gly Phe Thr Gly
 20 25 30

5 Gln Lys Cys Glu Thr
 35

<210> 10
 <211> 40
 10 <212> PRT
 <213> repetición 4 de EGF de NOTCH3
 <400> 10

Ser Asp Val Asp Glu Cys Arg Val Gly Glu Pro Cys Arg His Gly Gly
 1 5 10 15

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

20

Tyr Thr Gly Pro Leu Cys Glu Asn
 35 40

25

<210> 11
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> repetición 4 de EGF de NOTCH4
 30 <400> 11

Arg Asp Phe Cys Ser Ala Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Leu
 1 5 10 15

35

Ala Thr Tyr Pro Gln Ile Gln Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Glu Gly
 20 25 30

40

His Ala Cys Glu Arg
 35

45

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> CDR1 de cadena pesada
 <400> 12

50

Ser Ser Tyr Thr Met Ser
 1 5

55

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> CDR2 de cadena pesada
 <400> 13

60

Tyr Ile Asp Tyr Gly Gly Asp Phe Thr Ser Tyr Ser Asp Ala Ile Arg
 1 5 10 15

65

Gly

5 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> CDR3 de cadena pesada
 <400> 14

10 Arg Arg Tyr Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5

15 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> CDR1 de cadena ligera
 <400> 15

20 Ser Ala Ser Gln Ala Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

25 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> CDR2 de cadena ligera
 <400> 16

30 Tyr Thr Thr Asn Leu His Ser
 1 5

35 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> CDR3 de cadena ligera
 <400> 17

40 Gln Gln Tyr Ser Lys Phe Pro Trp Thr
 1 5

45 <210> 18
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> Polinucleótido de NOTCH1 para repeticiones 10-15 de EGF
 <400> 18

50

55

60

65

ES 2 413 087 T3

5
10
15
20
25

```

gcatgcatca gcaaccocctg taacgagggc tccaactgcg acaccaaccc tgtcaatggc      60
aaggccatct gcacctgccc ctcggggtac acgggcccgg cctgcagcca ggacgtggat      120
gagtgctcgc tgggtgccaa cccctgcgag catgcgggca agtgcacaa cacgctgggc      180
tccttcgagt gccagtgctc gcagggtac acgggcccc gatgagagat cgacgtcaac      240
gagtgcgtct cgaaccocgtg ccagaacgac gccacctgcc tggaccagat tggggagttc      300
cagtgcacat gcacgcccgg ctacgagggc gtgcactgcg aggtcaacac agacgagtgt      360
gccagcagcc cctgcctgca caatggccgc tgcctggaca agatcaatga gttccagtgc      420
gagtgcccc a cgggcttcac tgggcatctg tgccagtacg atgtggacga gtgtgccagc      480
acccocctgca agaatgggtg caagtgcctg gacggaccca acacttacac ctgtgtgtgc      540
acggaagggc acacggggac gcaactgagc gtggacatcg atgagtgcga ccccgacccc      600
tgccactacg gctcctgcaa ggacggcgtc gccacctca cctgcctctg ccgccagggc      660
tacacgggcc accactgcga g                                             681

```

<210> 19
<211> 227
<212> PRT
<213> Polinucleótido de NOTCH1 para repeticiones 10-15 de EGF

30
<400> 19

35
40
45
50
55
60
65

```

Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly Ser Asn Cys Asp Thr Asn
1           5           10           15

Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys Pro Ser Gly Tyr Thr Gly
          20           25           30

Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys Ser Leu Gly Ala Asn Pro
          35           40           45

Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Ile Asn Thr Leu Gly Ser Phe Glu Cys
          50           55           60

Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile Asp Val Asn
65           70           75           80

Glu Cys Val Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Gln
          85           90           95

Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro Gly Tyr Glu Gly Val His
          100          105          110

```

ES 2 413 087 T3

	Cys	Glu	Val	Asn	Thr	Asp	Glu	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Leu	His	Asn
			115					120					125			
5	Gly	Arg	Cys	Leu	Asp	Lys	Ile	Asn	Glu	Phe	Gln	Cys	Glu	Cys	Pro	Thr
		130					135					140				
10	Gly	Phe	Thr	Gly	His	Leu	Cys	Gln	Tyr	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ala	Ser
	145					150					155					160
15	Thr	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Cys	Leu	Asp	Gly	Pro	Asn	Thr	Tyr
					165						170					175
20	Thr	Cys	Val	Cys	Thr	Glu	Gly	Tyr	Thr	Gly	Thr	His	Cys	Glu	Val	Asp
				180						185						190
25	Ile	Asp	Glu	Cys	Asp	Pro	Asp	Pro	Cys	His	Tyr	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp
			195					200					205			
30	Gly	Val	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Leu	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	His
		210					215					220				
	His	Cys	Glu													
	225															

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo aislado que se une específicamente a una región de unión a no-ligando de un dominio extracelular de un receptor Notch humano, en el que la región de unión a no-ligando es las repeticiones 1-10 de EGF, y en el que el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan el receptor Notch.
2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de por lo menos dos miembros de la familia de receptores Notch.
- 10 3. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de NOTCH2.
4. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une específicamente a una región de unión a no-ligando del dominio extracelular de NOTCH1.
- 15 5. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Anticuerpo, según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
- 20 7. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está conjugado a un grupo citotóxico.
8. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une específicamente a una región de unión a no-ligando que comprende la repetición 4 de EGF.
- 25 9. Anticuerpo, según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo comprende
- (a) una región variable de cadena pesada que tiene las secuencias CDR establecidas en las SEQ ID NOS 12, 13 y 14; y
- 30 (b) una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias CDR establecidas en las SEQ ID NOS 15, 16 y 17.
10. Hibridoma que produce el anticuerpo, según la reivindicación 5.
11. Anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para utilizar en el tratamiento del cáncer.
- 35 12. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 11, en el que el tratamiento comprende una prueba genética en una primera etapa para identificar pacientes adecuados para el tratamiento con dicho anticuerpo.
- 40 13. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 12, en el que dicha prueba genética comprende detectar una firma de células madre de cáncer.
14. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 11, en el que:
- 45 (i) el tratamiento comprende administrar el anticuerpo con quimioterapia; o
- (ii) el tratamiento comprende administrar el anticuerpo con un anticuerpo adicional contra un antígeno asociado a tumor adicional; o
- (iii) el tratamiento comprende administrar el anticuerpo con terapia de radiación.
- 50 15. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 14, en que la quimioterapia comprende taxol, irinotecán u oxaliplatino.
16. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 15, en el que:
- 55 (i) el tratamiento comprende administrar el anticuerpo y la quimioterapia comprende taxol de manera simultánea; o
- (ii) el tratamiento comprende administrar el anticuerpo posteriormente a la quimioterapia que comprende taxol.
17. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que dichas células tumorales son de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor pancreático, tumor de próstata o un tumor de cabeza y cuello.
- 60 18. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo adicional es un anticuerpo contra un ligando de receptor NOTCH o contra VEGF.
- 65 19. Anticuerpo, según la reivindicación 11, para utilizar según la reivindicación 18, en el que el anticuerpo contra un ligando de receptor Notch es un anticuerpo contra DLL4 o un anticuerpo contra JAG 1.

20. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

21. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

5

**Figura 1A Mapeo de epítomos de mAb
13M57**

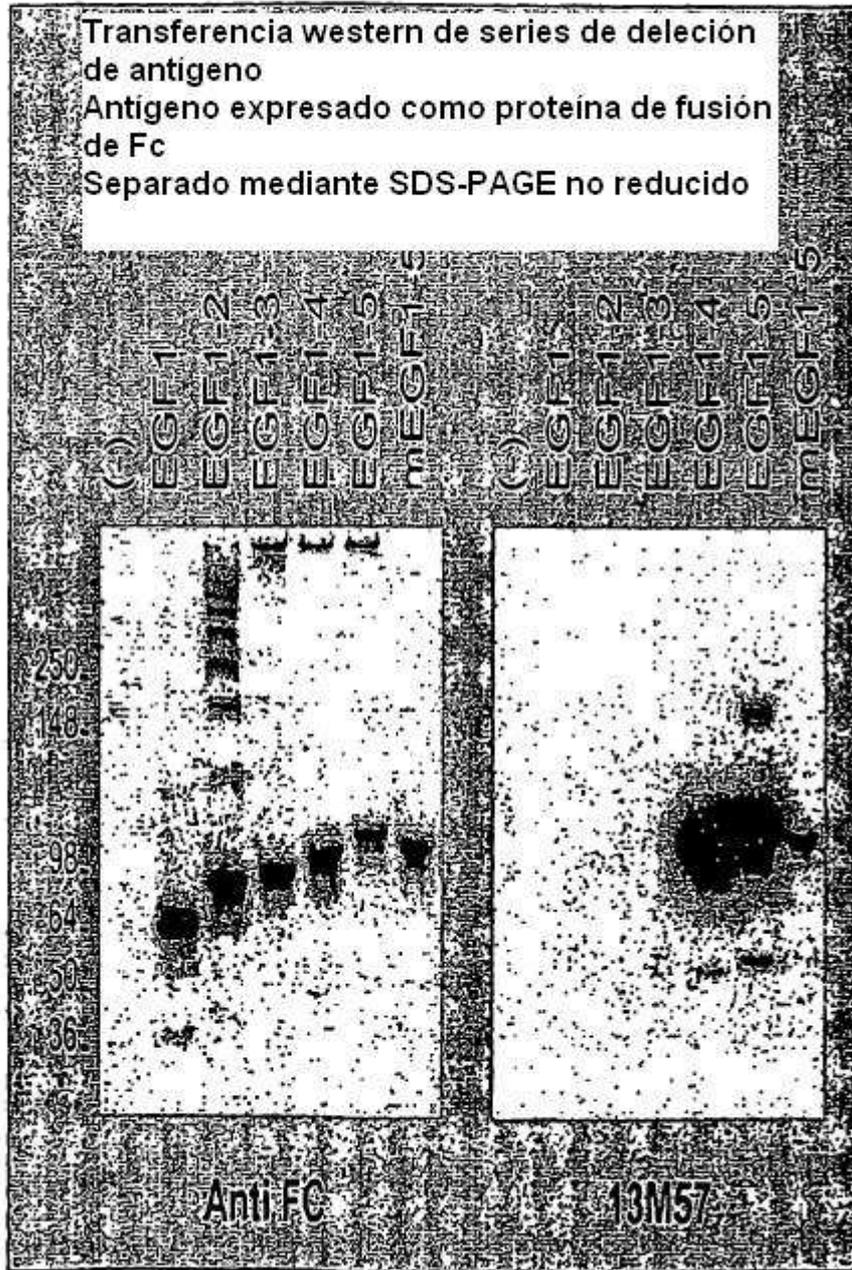


Figura 1b Mapeo de epítomos de mAb 13M57

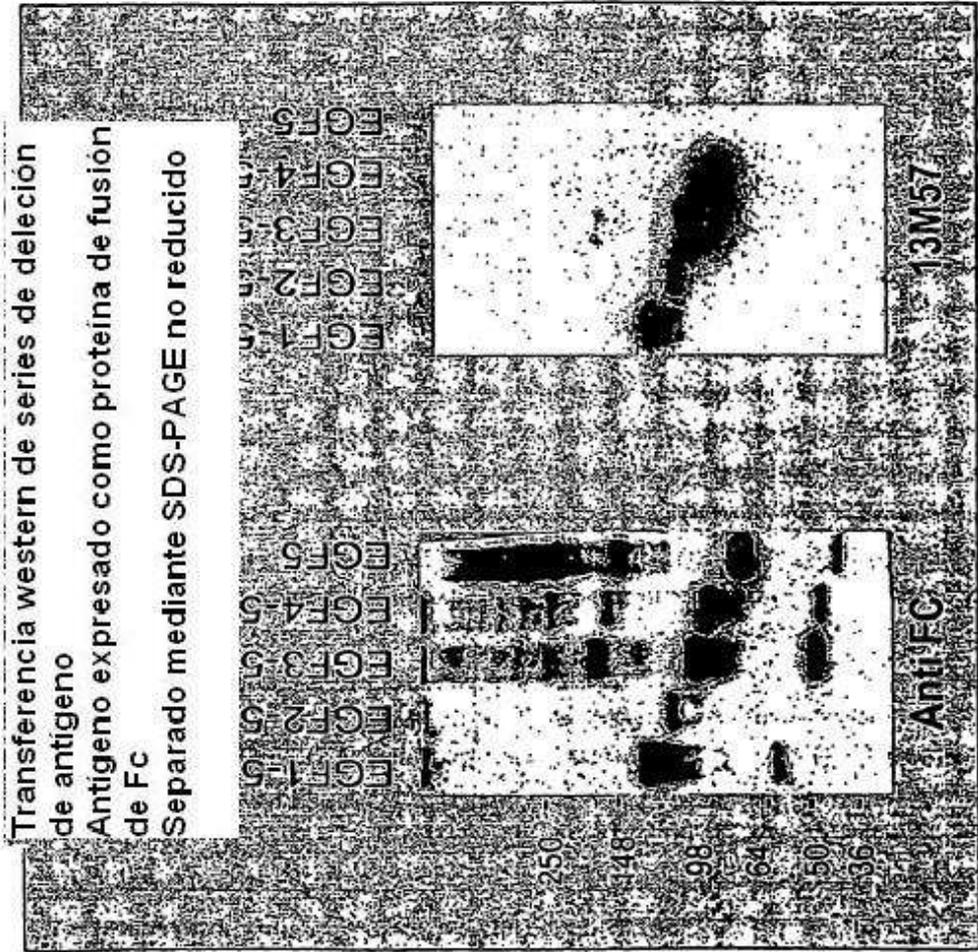


Figura 1C Mapeo de epítomos de mAb 31M80

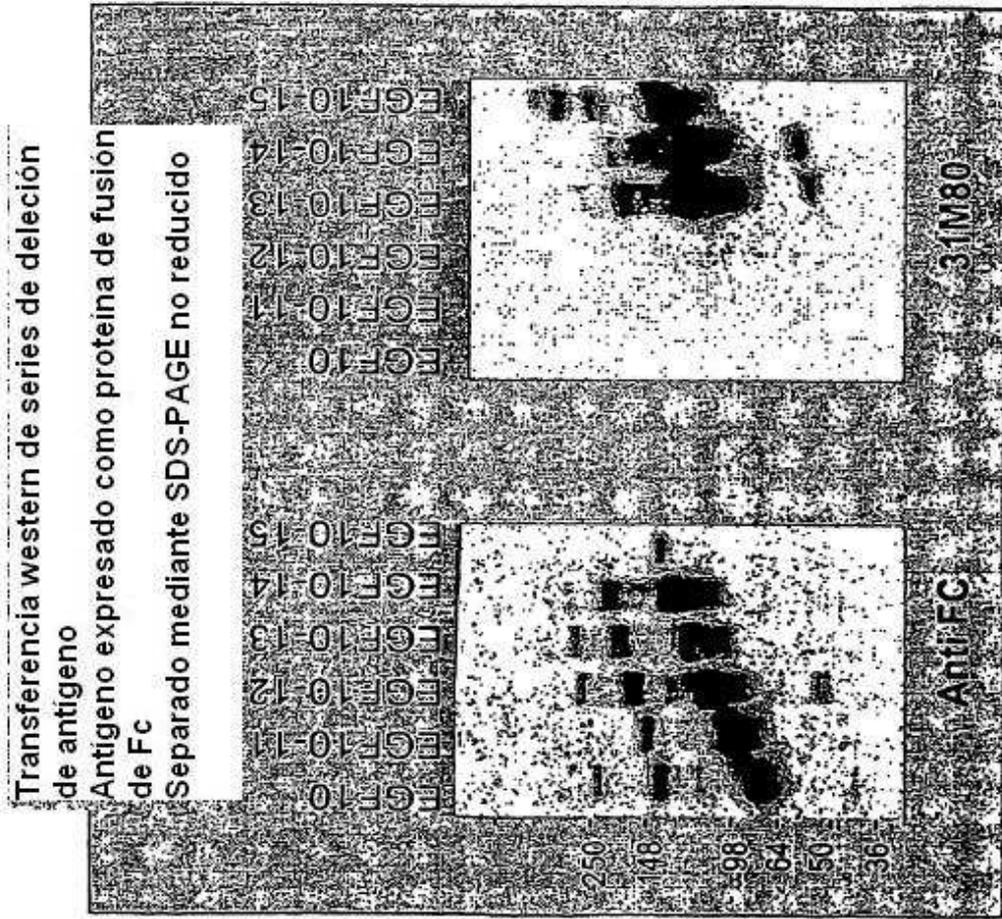


Figura 2A

El mAb 13M57 se une a Notch1 de la superficie celular

Representaciones FACS que demuestran la unión de 13M57 a células que expresan Notch

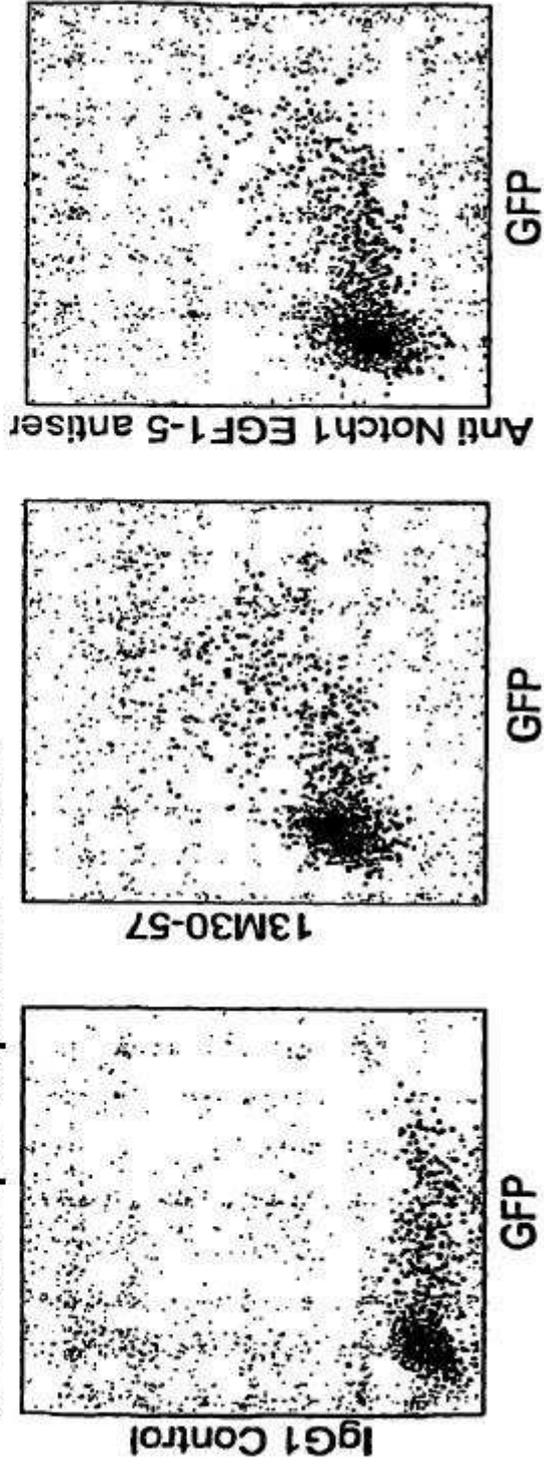


Figura 2B 31M80 no es específico para Notch1

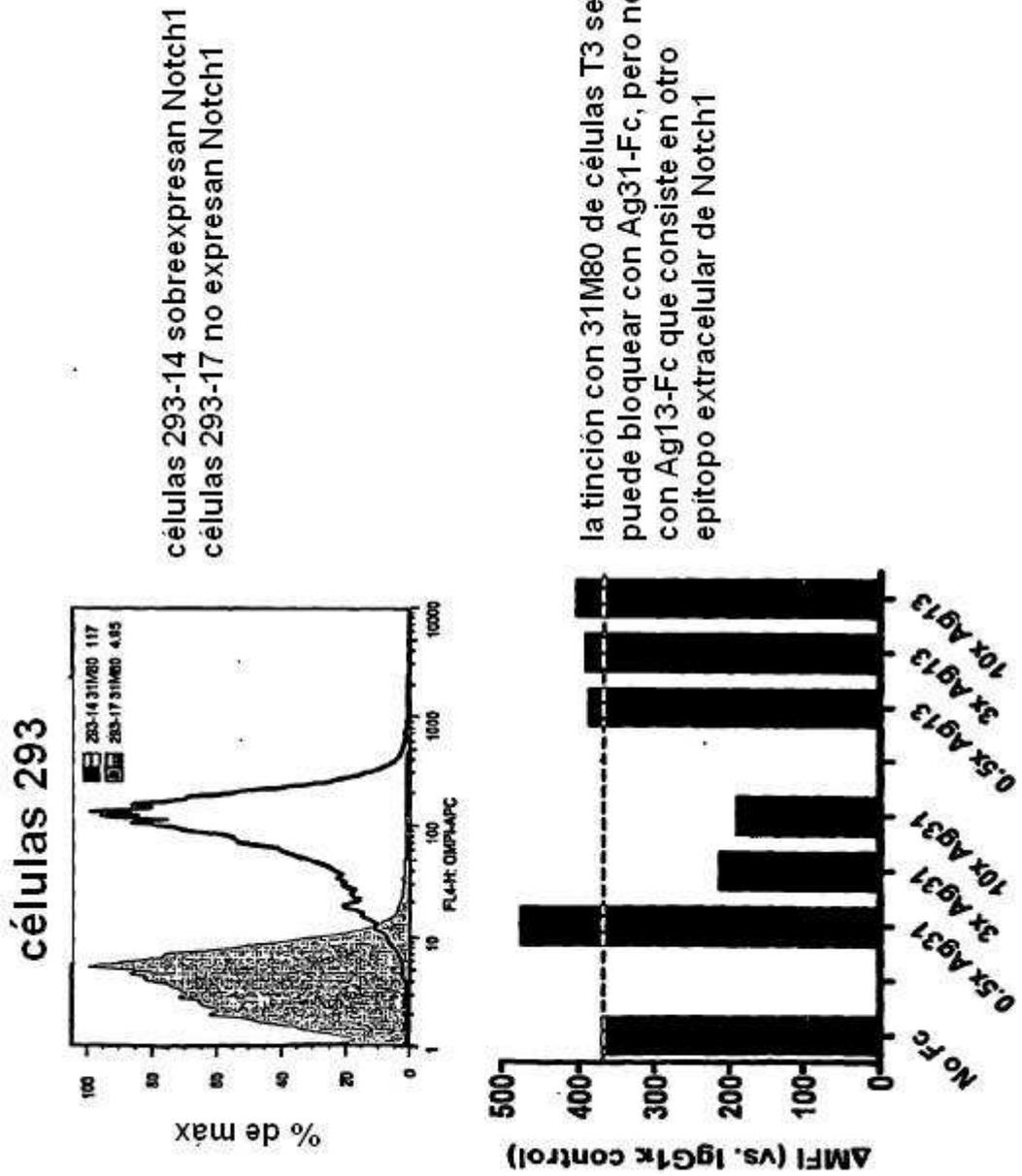


Figura 2C

mAbs OMPI detectan Notch1 en células de tumor de mama AgX+CD44+

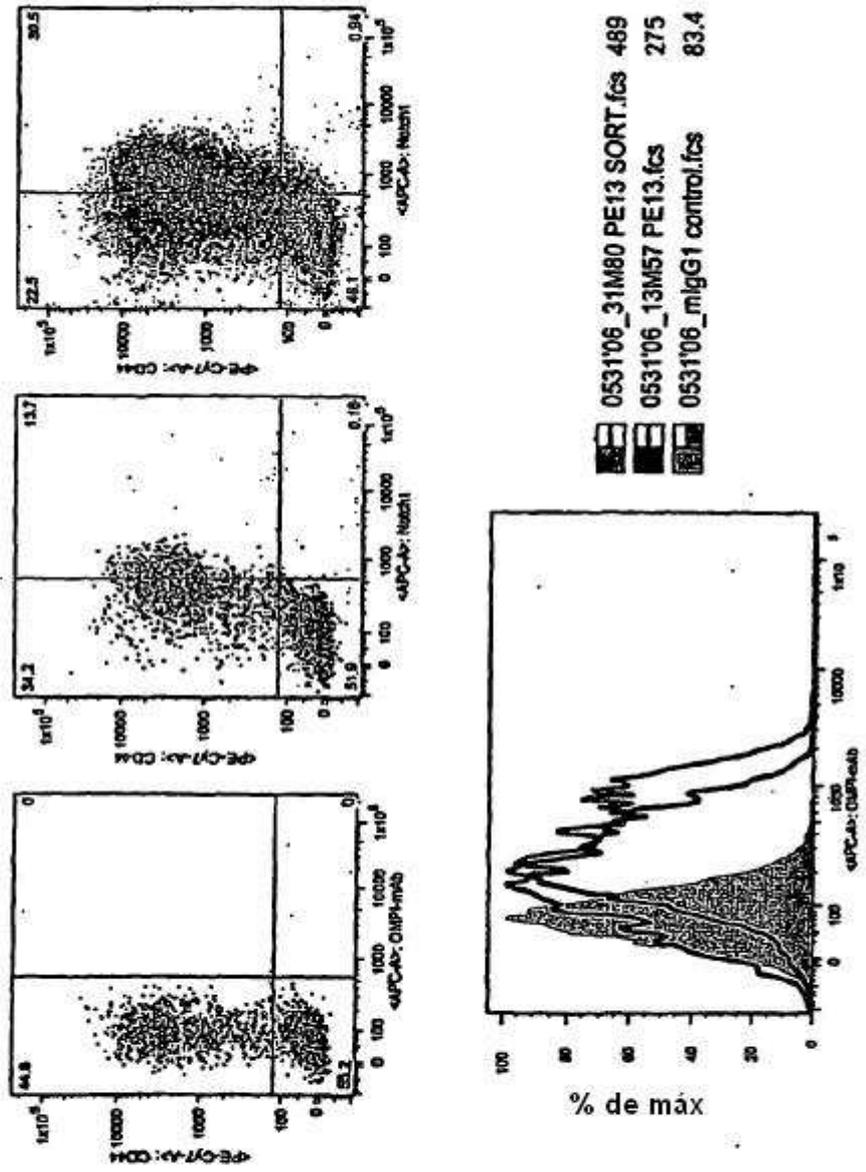
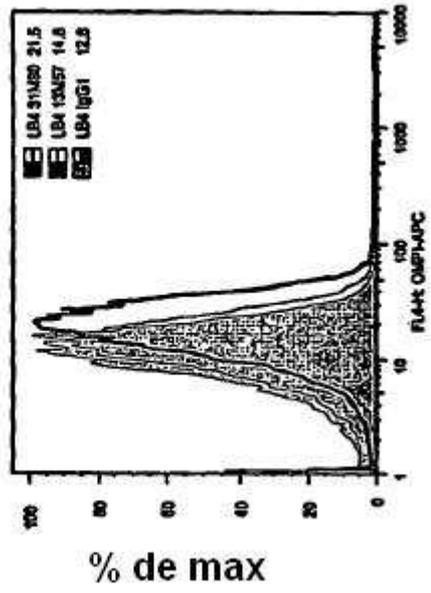
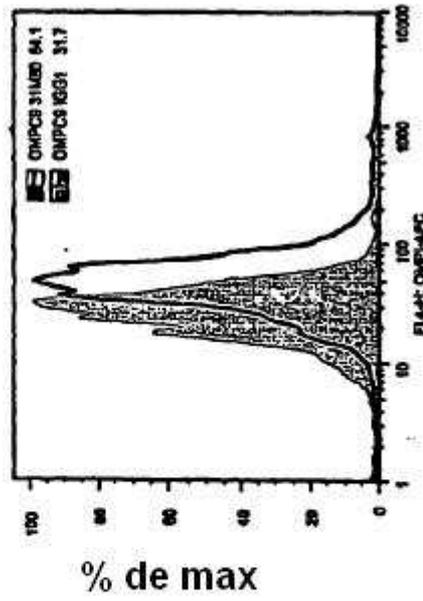


Figura 2D

Notch1 se expresa en células de tumores de colon



UM-C4



OMP-C9

Figura 3

Inhibición de unión a ligando por los anticuerpos anti-Notch

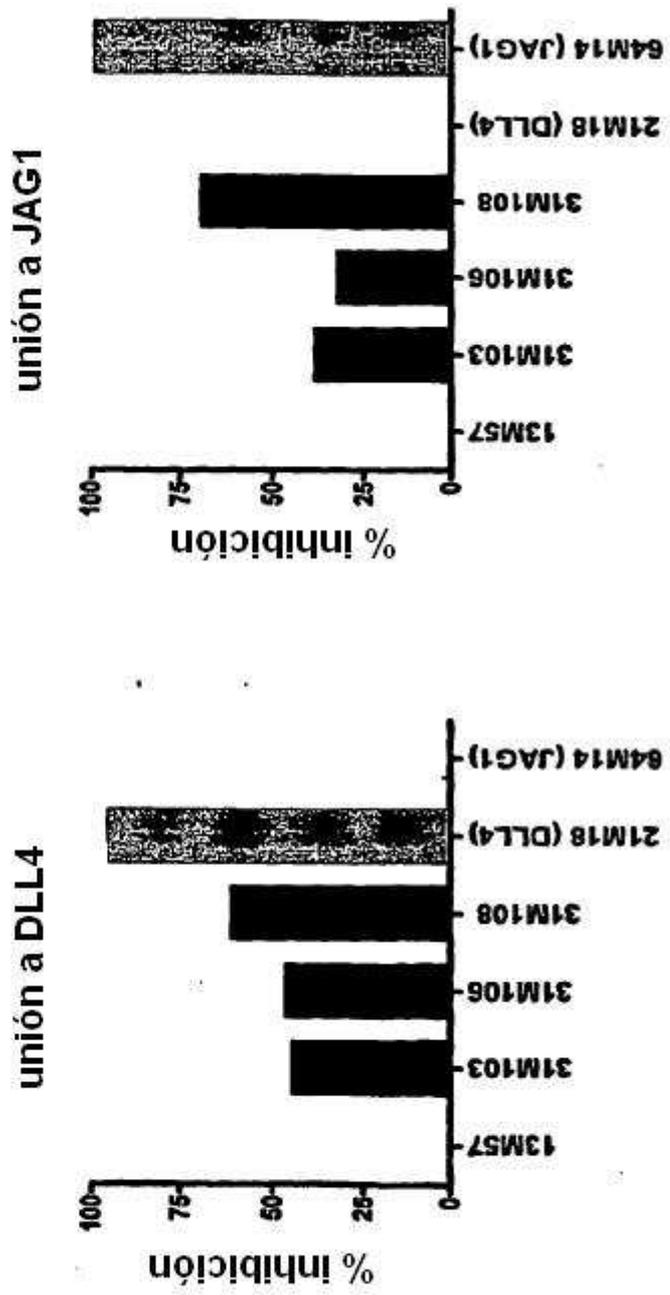
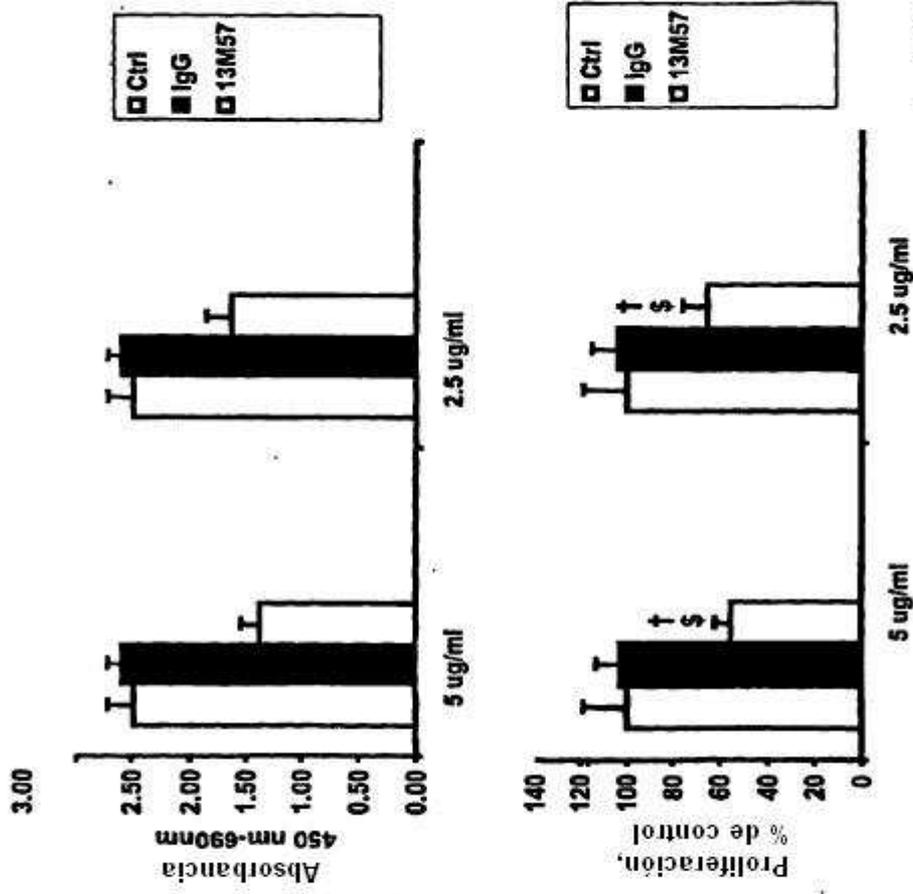


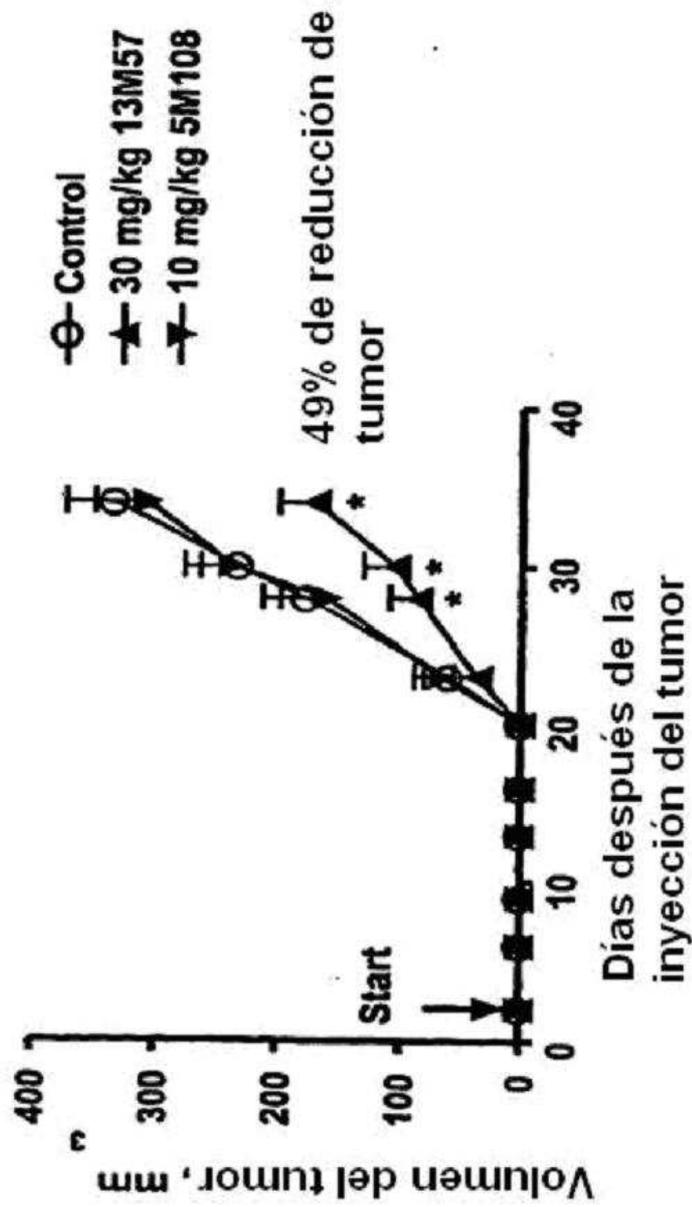
Figura 4
Efecto de mAB de Notch 1 en el crecimiento de UM-T3 in vitro
(BrdU)



†: $p < 0.05$ vs. Control
 \$: $p < 0.05$ vs. IgG
 ANOVA de una cola seguido de
 test de Tukey

Figura 5

Anticuerpo 13M57 reduce el crecimiento de PE13



*: Significativamente diferente de control $p < 0,05$
ANOVA seguido del test de Dunnett

Fig. 6A

13M57 (anti-Notch1) en Colon (OMP-C9)

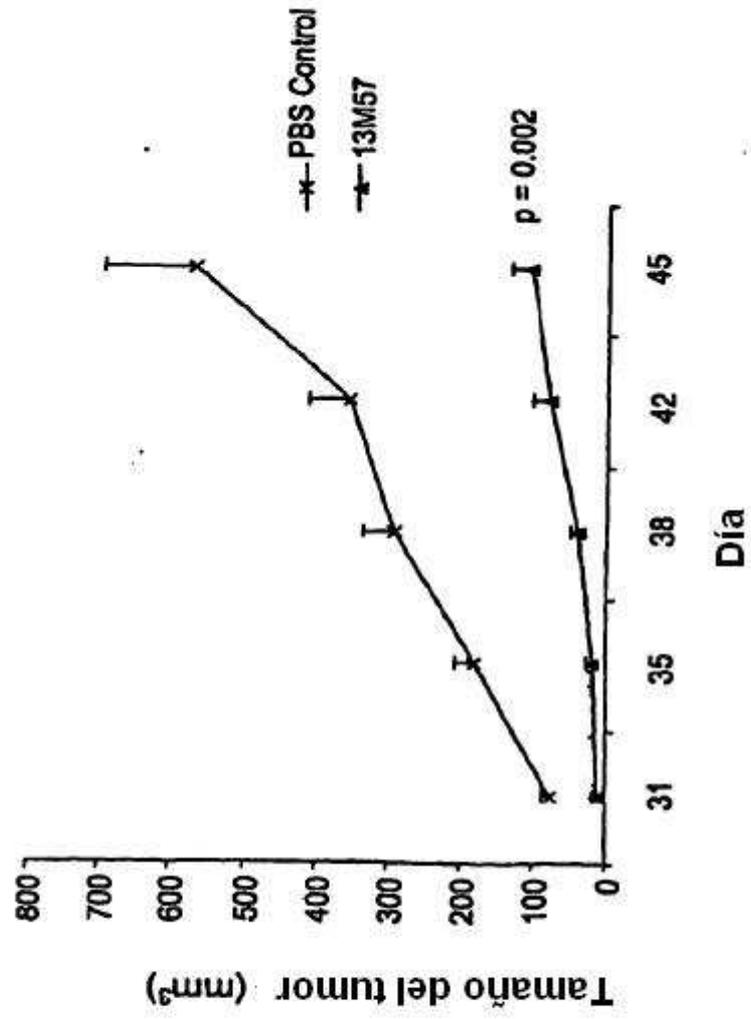


Figura 6b

Anticuerpo NOTCH1 contra EGF14 y EGF13 tienen actividad antitumoral

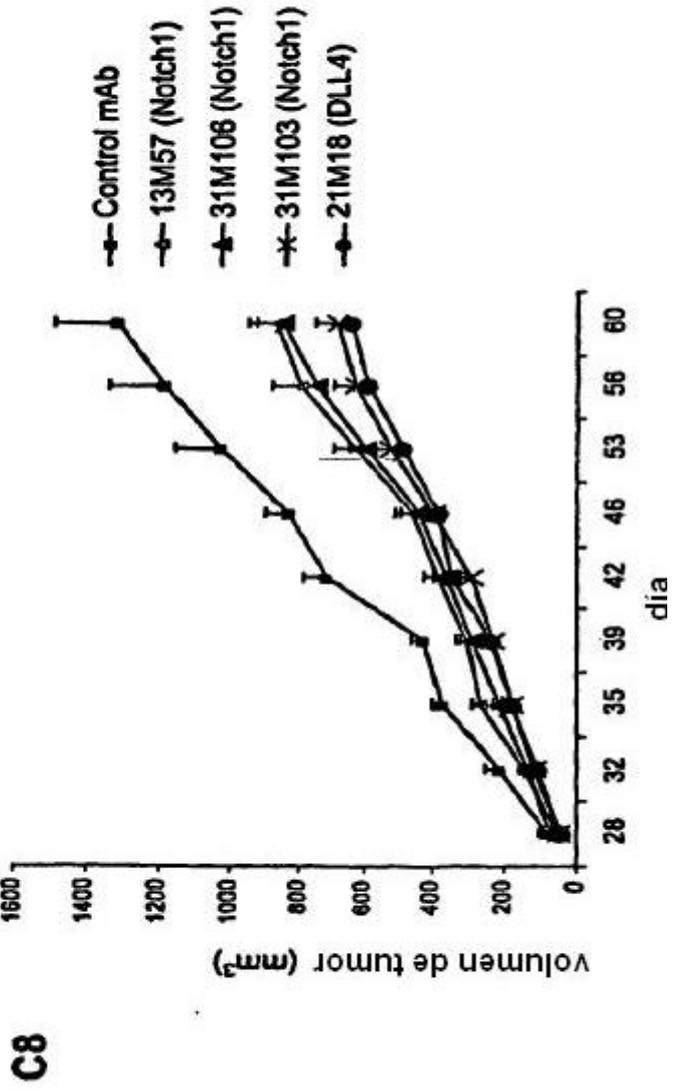


Figura 7A

Anticuerpo 13M57 reduce el crecimiento de células PE13 que expresan luciferasa

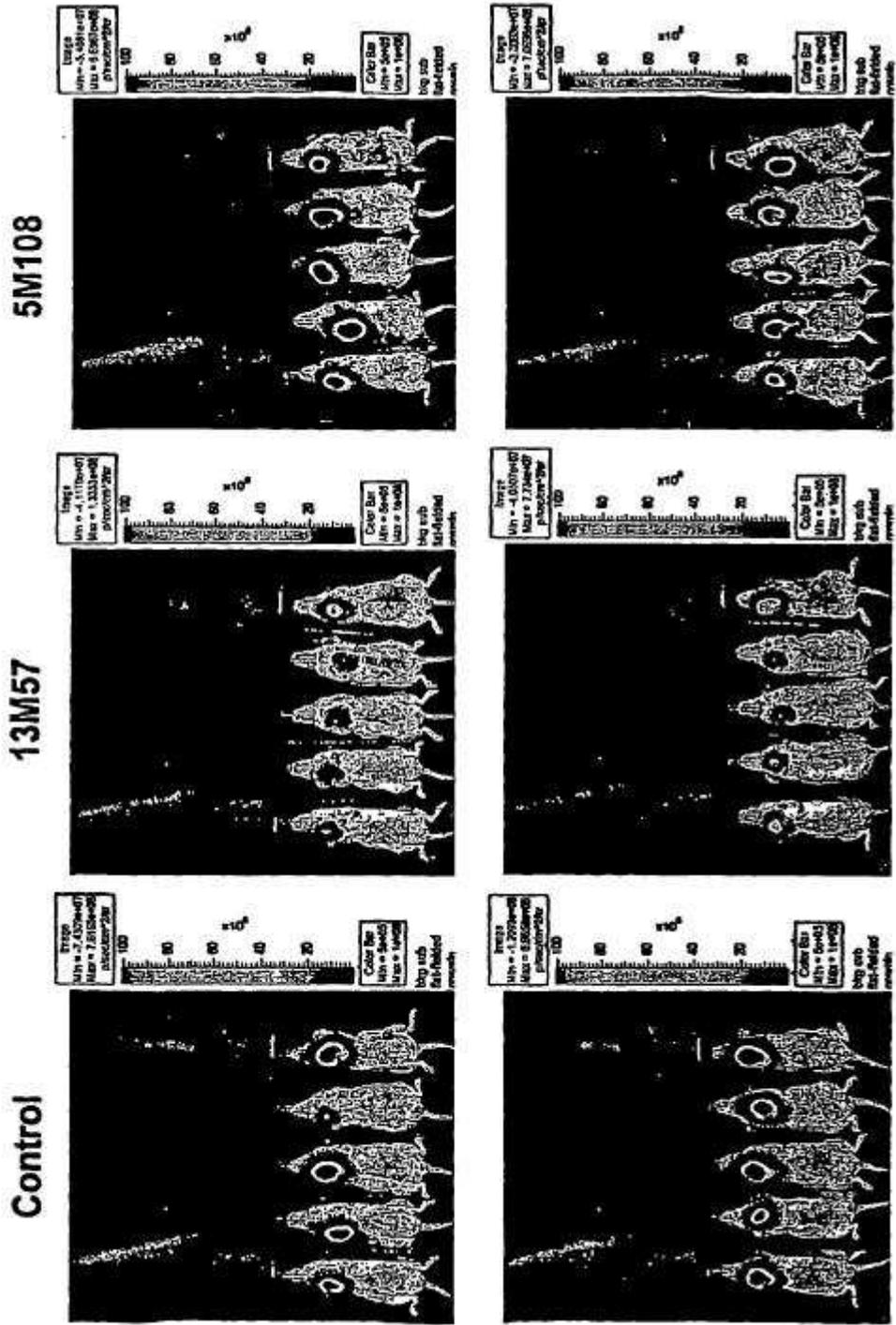
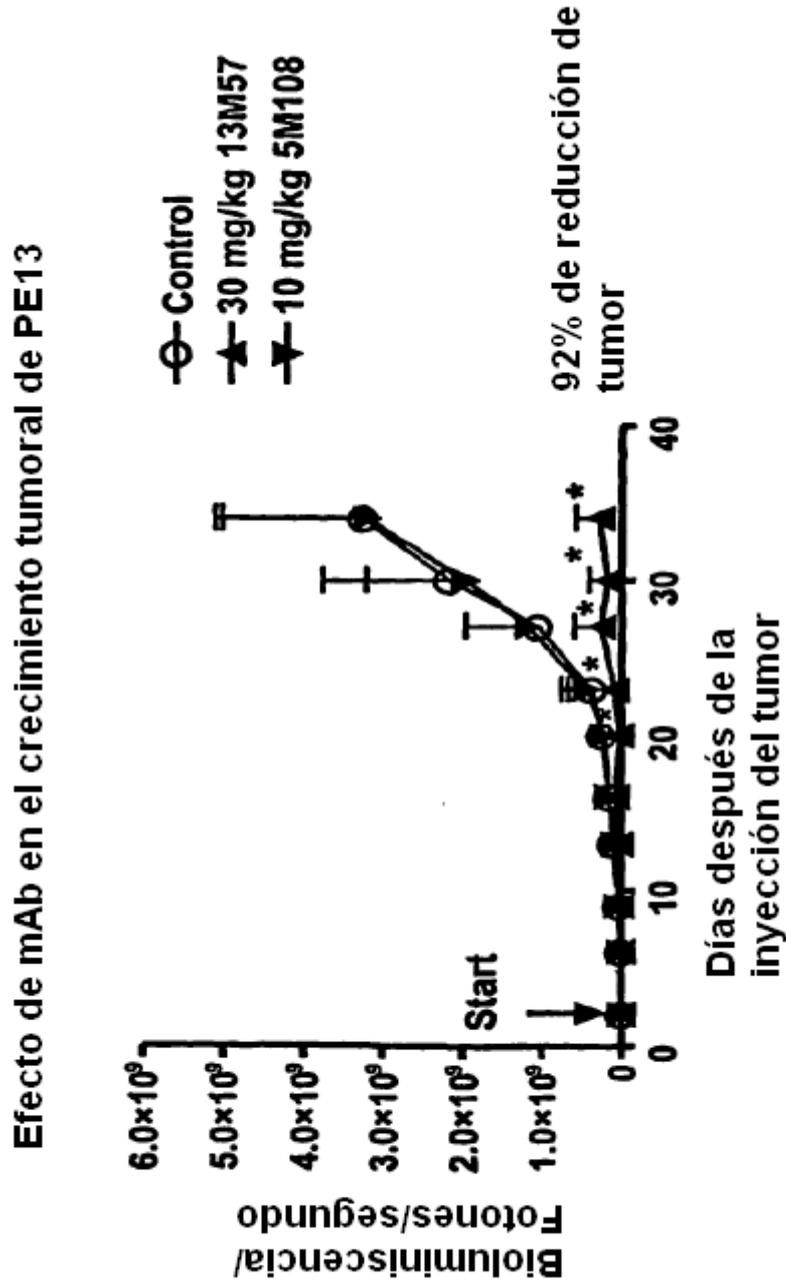


Figura 7B

Cuantificación de datos de xenógeno para la reducción del crecimiento tumoral



*: Significativamente diferente de control a $p < 0,05$
ANOVA seguido de test de Dunnett

Figura 8

59M7 (anti-Notch2) reduce el crecimiento de tumores de colon C6

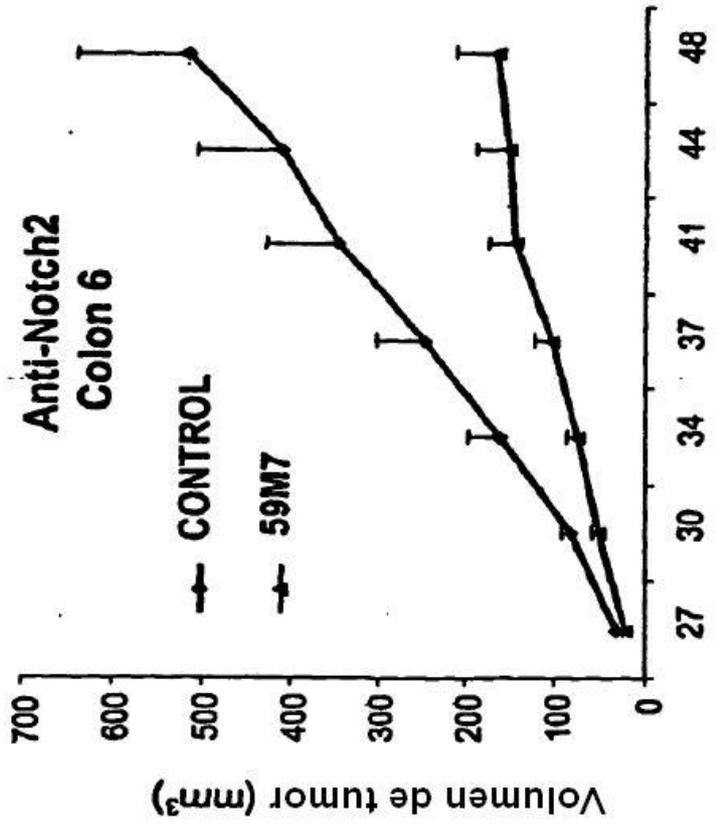


Figura 9A

El tratamiento de combinación con taxol y anticuerpo anti-Notch1 13M57 retrasa la reaparición del tumor

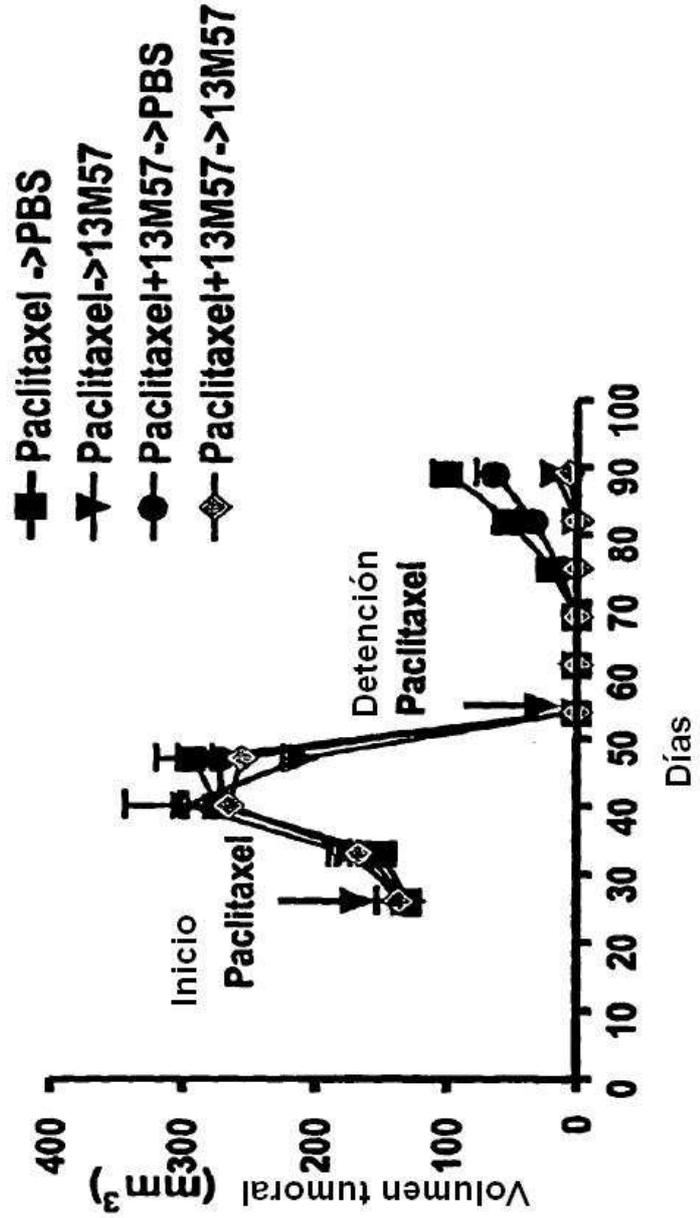


Figura 9B

Reaparición de tumores de animales individuales después del tratamiento de combinación con taxol y anticuerpo anti-Notch1 13M57

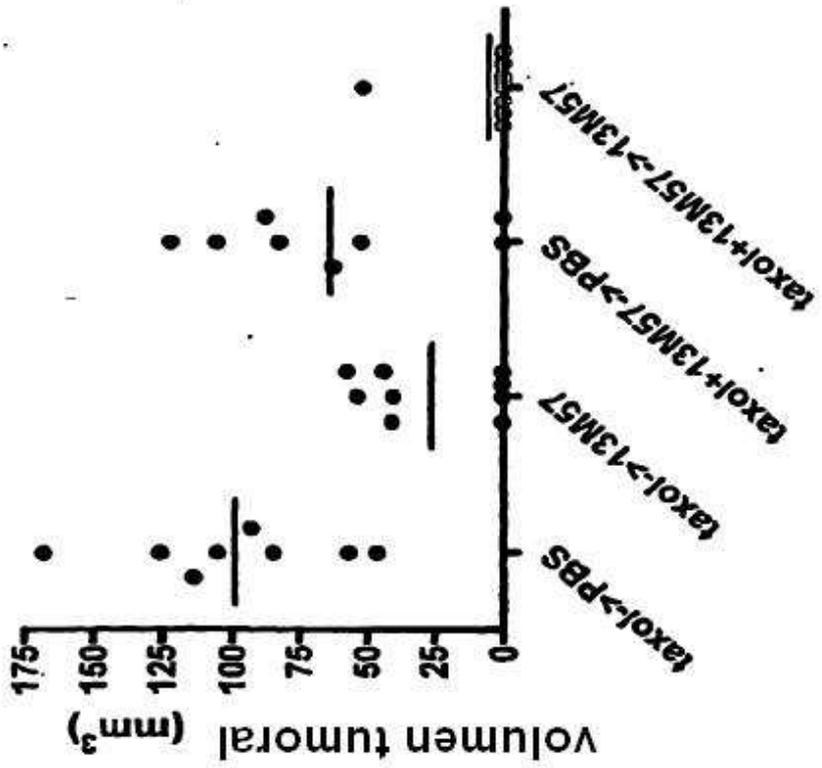


Figura 10A

Sinergia de 13M57 anti-Notch1 e Irinotecan en tumor de colon C8

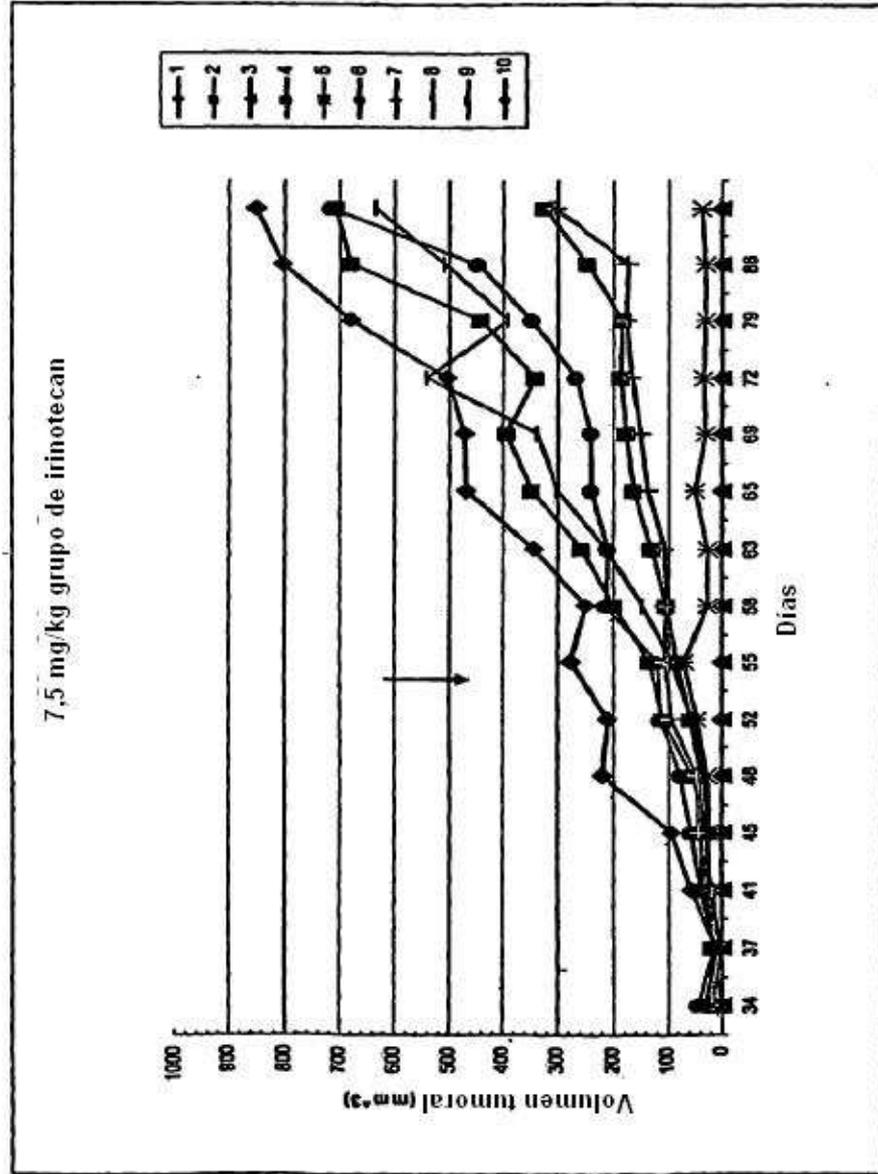


Figura 10B

Sinergia de 13M57 anti-Notch1 e Irinotecan en tumor de colon C8

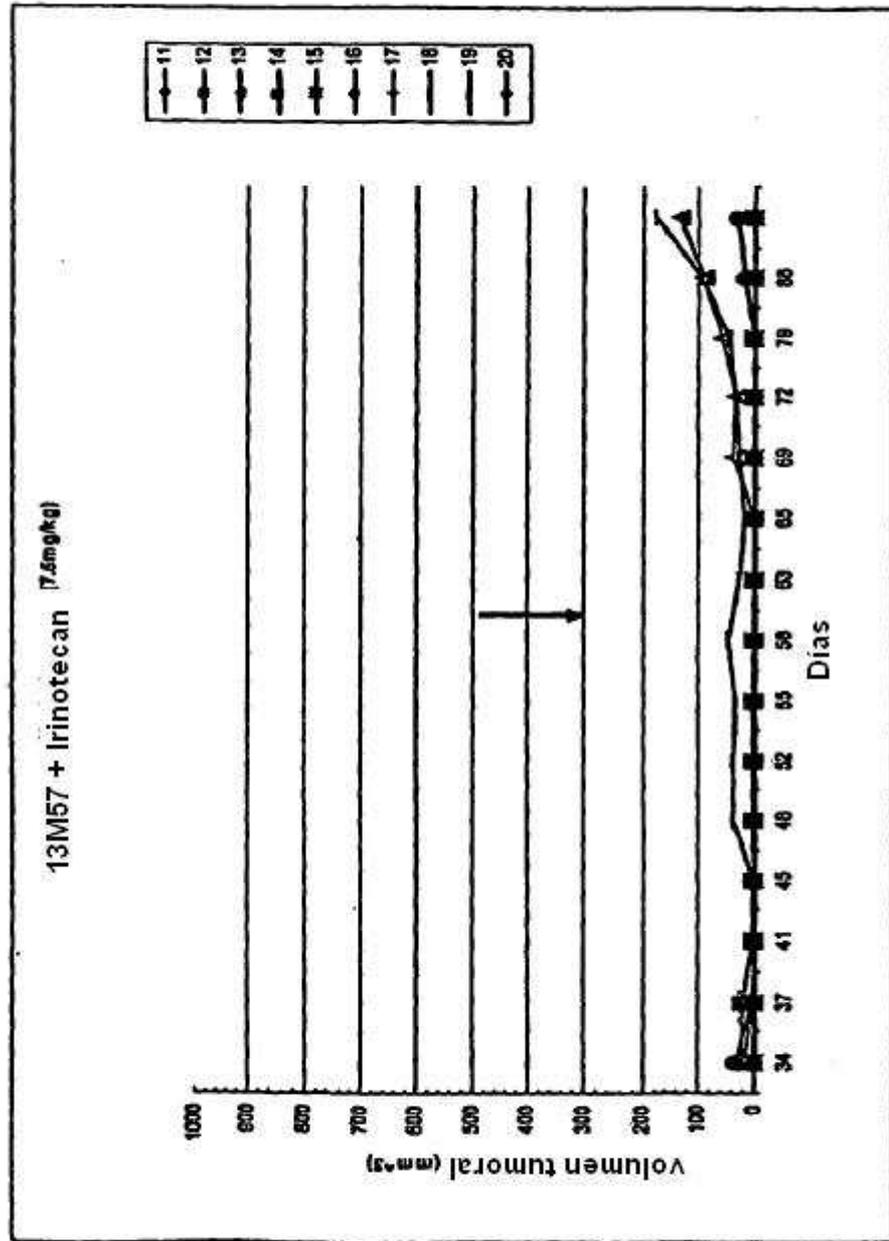


Figura 11

Anti-Notch1 presenta sinergia con oxaliplatino para inhibir tumores de colon establecidos

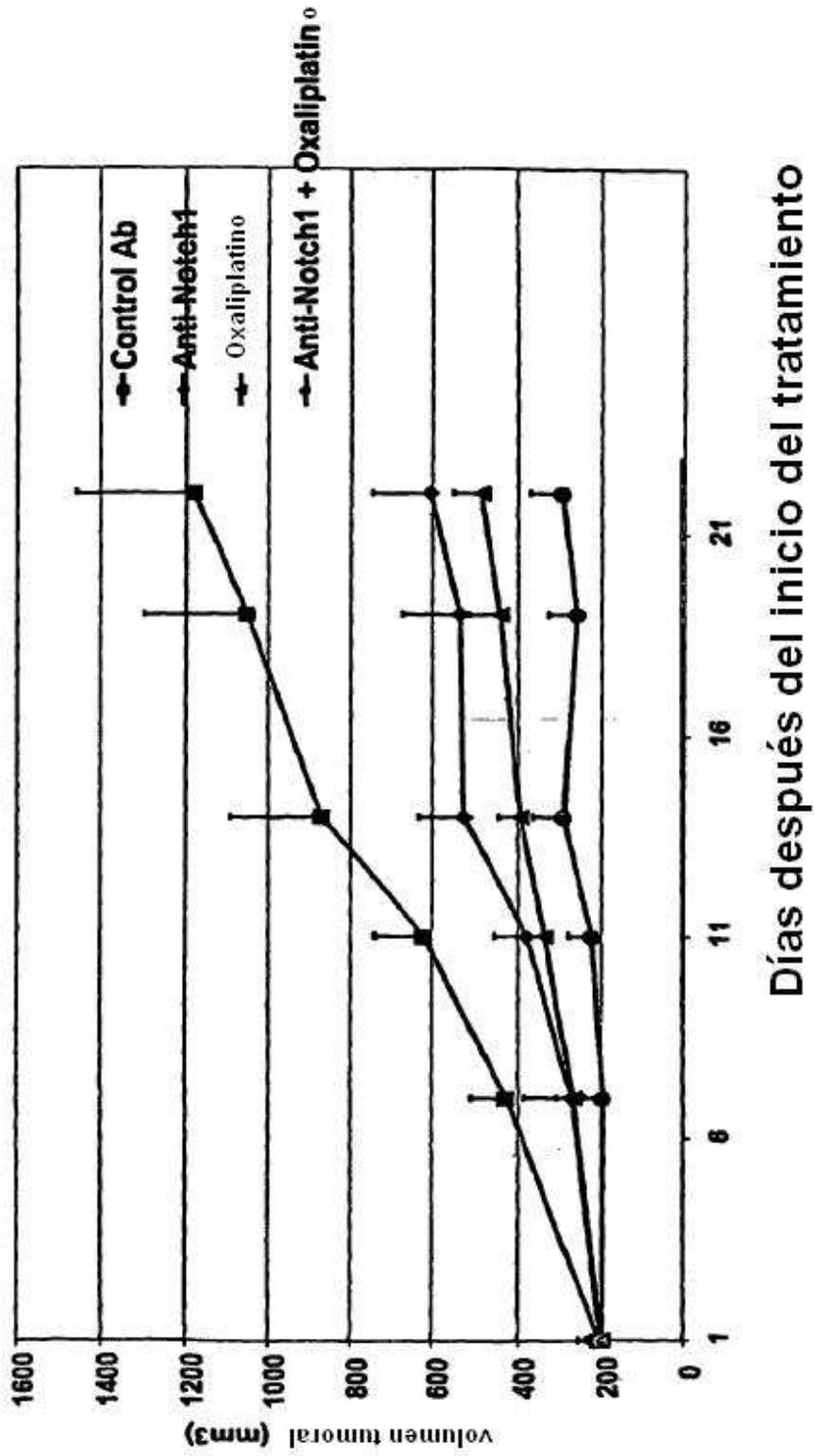
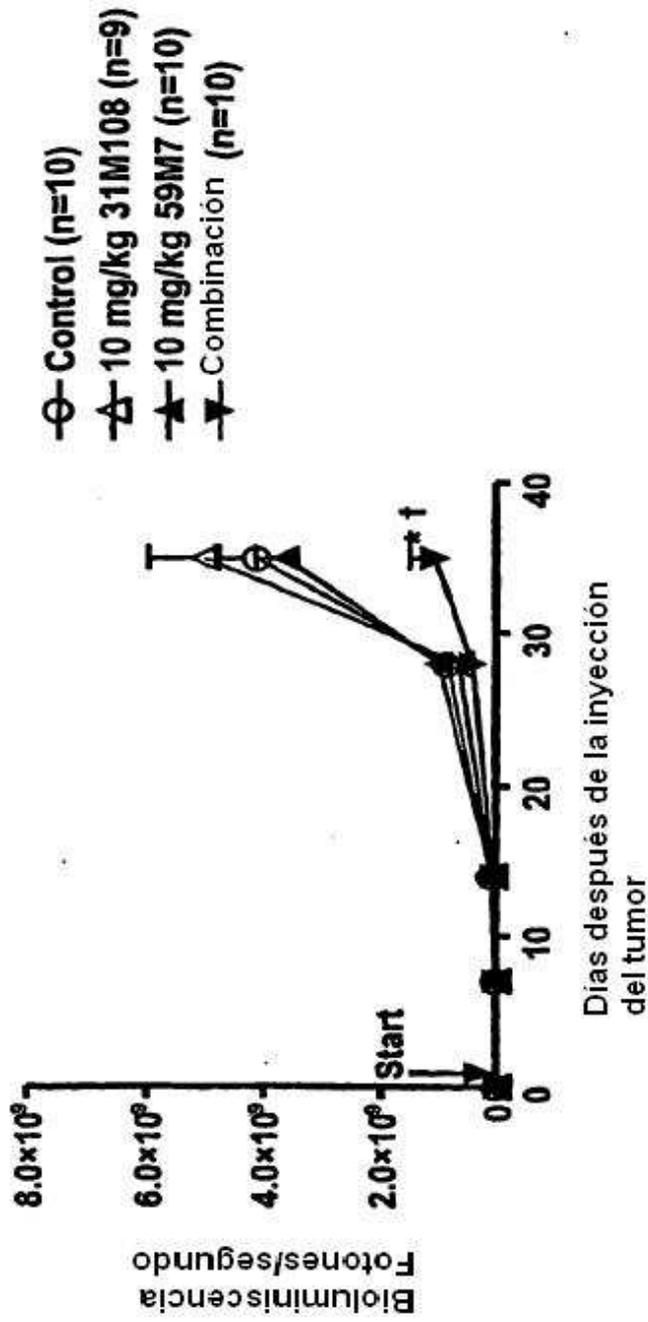


Figura 12A

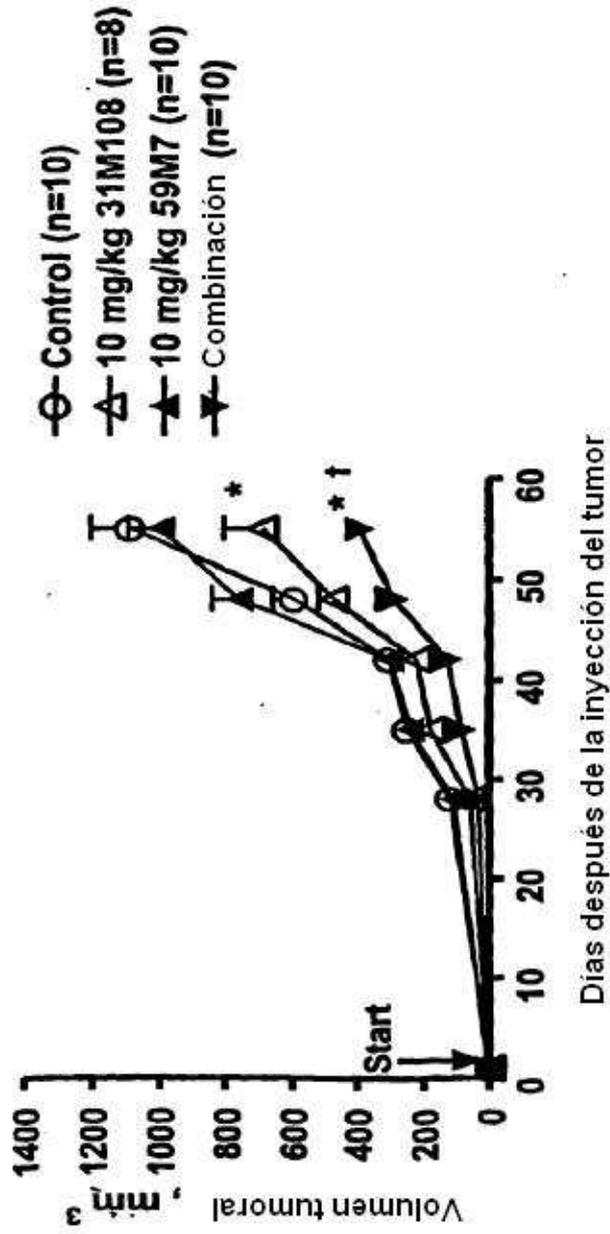
Efecto de la combinación
31M108+59M7 en el crecimiento de
tumores de xenoinjerto PE13
(Bioluminiscencia)



*: P<0.05 vs. Control
t: P<0.05 vs. Agentes individuales
ANOVA seguido de test de Tukey

Figura 12B

Efecto de la combinación
31M108+59M7 en el crecimiento de
tumores de xenoinjerto PE13
(volumen tumoral)



*: $P < 0.05$ vs. Control

t: $P < 0.05$ vs. Agentes individuales
ANOVA seguido de test de Tukey