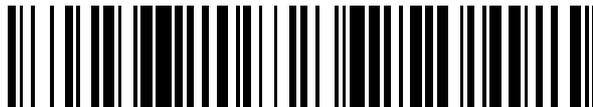


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 614**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 09794821 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2307051**

54 Título: **Agentes de unión a Notch y antagonistas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

08.07.2008 US 79095 P
07.11.2008 US 112701 P
07.11.2008 US 112699 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2015

73 Titular/es:

ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

GURNEY, AUSTIN L.;
HOEY, TIMOTHY CHARLES;
HTUN VAN DER HORST, EDWARD THEIN;
SATO, AARON KEN;
LIU, YUAN CHING;
BRUHNS, MAUREEN FITCH y
LEWICKI, JOHN A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 535 614 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de unión a Notch y antagonistas y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un agente que se une a un receptor Notch humano y a métodos para usar estas composiciones para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades. De manera más específica, la presente invención proporciona, por ejemplo, anticuerpos que se unen de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano y que inhiben el crecimiento tumoral. La presente invención proporciona además composiciones para uso en métodos para tratar cáncer, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de una proteína de receptor Notch humano y que inhibe el crecimiento tumoral.

15 **Antecedentes de la Invención**

La ruta de señalización Notch es uno de los varios reguladores críticos de la formación de patrones embrionarios, del mantenimiento de tejido post-embrionario, y de la biología de las células madre. De manera más específica, la señalización Notch está comprendida en el proceso de inhibición lateral entre destinos celulares adyacentes y juega un papel importante en la determinación de destinos celulares durante las divisiones celulares asimétricas. Se asocia la señalización Notch no regulada con numerosos cánceres humanos donde puede alterar el destino de desarrollo de células tumorales para mantenerlas en un estado no diferenciado y proliferativo (Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69). De esta manera, la carcinogénesis puede proseguir al usurpar mecanismos homeostáticos que controlan el desarrollo normal y reparación de tejido por poblaciones de células madre (Beachy *et al.*, 2004, Nature 432:324).

El receptor Notch se identificó primero en mutantes de *Drosophila* con haploinsuficiencia que da por resultado muescas (notches, en inglés) en el margen del ala, donde la pérdida de función produce un fenotipo "neurogénico" embrionario letal, donde las células de la epidermis cambian el destino a tejido neural (Moohr, 1919, Genet. 4:252; Poulson, 1937, PNAS 23:133; Poulson, 1940, J. Exp. Zool. 83:271). El receptor Notch es un receptor transmembrana de una sola pasada que contiene numerosas repeticiones en tándem tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y tres repeticiones Notch/LIN-12 de alto contenido de cisteína dentro de 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 mamíferas (Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4), y las mutaciones en estos receptores dan por resultado de manera invariable anomalías de desarrollo y patologías humanas que incluyen varios cánceres como se describe en detalle más adelante (Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103; Joutel & Tournier-Lasserre, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25).

Los receptores Notch se activan por los ligandos transmembrana de una sola pasada de la familia Delta, Serrada, Lag-2 (DSL). Existen cinco ligandos Notch conocidos en los mamíferos: tipo Delta 1 (DLL1), tipo Delta 3 (DLL3), tipo Delta 4 (DLL4), Dentado 1 (JAG1) y Dentado 2 (JAG2) caracterizados por un dominio DSL y repeticiones en tándem tipo EGF dentro del dominio extracelular. El dominio extracelular del receptor Notch interactúa con aquel de sus ligandos, normalmente en células adyacentes, que da por resultado dos escisiones proteolíticas de Notch, una escisión extracelular mediada por una proteasa ADAM (Una Disintegrina y Metalopeptidasa) y una escisión dentro del dominio transmembrana mediada por gamma-secretasa. Esta última escisión genera el dominio intracelular Notch (ICD), que entonces entra al núcleo donde activa el CBF1, supresor de sin pelo [Su(H)], familia Lag-2 (CSL) de factores de transcripción como los efectores principales de etapa posterior para incrementar la transcripción de factores de transcripción de hélice-asa-hélice, básicos, nucleares de la familia de peludo y mejorador de división [E(sp1)] (Artavanis *et al.*, 1999, Science 284:770; Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69; Iso *et al.*, 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:543). Las rutas intracelulares alternativas que comprenden el dominio citoplásmico Deltex identificadas en *Drosophila* también pueden existir en mamíferos (Martinez *et al.*, 2002, Curr. Opin. Genet. Dev. 12:524-33), y esta ruta dependiente de Deltex puede actuar para suprimir la expresión de los genes objetivo Wnt (Brennan *et al.*, 1999, Curr. Biol. 9:707-710; Lawrence *et al.*, 2001, Curr. Biol. 11:375-85).

Los receptores Notch mamíferos experimentan escisión para formar el receptor maduro y también después de la unión al ligando para activar la señalización de etapa posterior. Una proteasa tipo furina escinde los receptores Notch durante la maduración para generar heterodímeros de juxtamembrana que comprenden una subunidad extracelular no covalentemente asociada y una subunidad transmembrana mantenida conjuntamente en un estado auto-inhibitorio. La unión a ligando alivia esta inhibición e induce la escisión del receptor Notch por una metaloproteasa tipo ADAM y una gamma-secretasa, esta última que libera el dominio intracelular (ICD) en el citoplasma, dejándolo translocarse al núcleo para activar la transcripción génica. La escisión por ADAM se presenta dentro del dominio de escisión de no unión a ligando dentro de la región reguladora negativa próxima de membrana.

- Las células madres hematopoyéticas (HSC) son las células madre mejor entendidas en el cuerpo, y la señalización 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 reside en un nicho del estroma dentro de la médula ósea de adulto. Estas células se caracterizan tanto por un perfil único de expresión génica así como la capacidad para dar lugar en forma continua a células progenitoras más diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético completo. La activación constitutiva de la señalización Notch1 en las HSC y en las células progenitoras establece líneas celulares inmortalizadas que generan células tanto linfoides como mieloides *in vitro* y en ensayos de reconstitución de largo plazo (Varnum-Finney *et al.*, 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), y en la presencia de Dentado1 incrementa el implante de poblaciones de células de médula ósea humana enriquecidas para HSC (Karanu *et al.*, 2000, *J. Exp. Med.* 192:1365-72). Más recientemente, se ha demostrado señalización Notch en HSC *in vivo* y muestra que están comprendidas en la inhibición de la diferenciación de las HSC. Adicionalmente, parece que la señalización Notch se requiere para la auto-renovación de las HSC mediada por Wnt (Duncan *et al.*, 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).
- La ruta de señalización Notch también desempeña un papel central en el mantenimiento de células madre neurales y está implicada en su mantenimiento normal así como en cánceres de cerebro (Kopper & Hajdu, 2004, *Pathol. Oncol. Res.* 10:69-73; Purow *et al.*, 2005, *Cancer Res.* 65:2353-63; Hallahan *et al.*, 2004, *Cancer Res.* 64:7794-800). Las células madre neurales dan lugar a todas las células neuronales y gliales en el sistema nervioso mamífero durante el desarrollo, y más recientemente se han identificado en el cerebro de adulto (Gage, 2000, *Science* 287:1433-8). Los ratones deficientes de Notch1; los genes objetivos de Notch *Hes1*, *3*, y *5*; y un regulador de la señalización Notch, la presenilina (PS1) muestran números disminuidos de células madre neurales embrionarias. Adicionalmente, las células madre neurales de adulto se reducen en los cerebros de ratones heterocigotos de PS1 (Nakamura *et al.*, 2000, *J. Neurosci.* 20:283-93; Hitoshi *et al.*, 2002, *Genes Dev.* 16:846-58). La reducción en las células madre neurales parece resultar de su diferenciación premadura en neuronas (Hatakeyama *et al.*, 2004, *Dev.* 131:5539-50) sugiriendo que la señalización Notch regula la diferenciación y autorenovación de células madre neurales.
- La señalización Notch anormal está implicada en varios cánceres humanos. El gen Notch1 en humanos se identificó primero en un subconjunto de leucemias linoblásticas agudas de células T como un locus translocado que da por resultado la activación de la ruta Notch (Ellisen *et al.*, 1991, *Cell* 66:649-61). La activación constitutiva de la señalización Notch1 en células T en modelos de ratón genera de manera similar linfomas de células T que sugieren un papel causante (Robey *et al.*, 1996, *Cell* 87:483-92; Pear *et al.*, 1996, *J. Exp. Med.* 183:2283-91; Yan *et al.*, 2001, *Blood* 98:3793-9; Bellavia *et al.*, 2000, *EMBO J.* 19:3337-48). También, se ha encontrado que las mutaciones, inserciones puntuales Notch1 que producen señalización Notch1 normal están frecuentemente presentes tanto en leucemia linfoblástica/linfoma, agudo, de células T, en niños y adultos (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).
- La inserción frecuente del virus de tumor mamario de ratón tanto en el locus Notch1 como el Notch4 en tumores mamaros y los fragmentos resultantes activados de proteína Notch, implicaron primero a la señalización Notch en 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). Los estudios adicionales en ratones transgénicos han confirmado un papel de Notch en la ramificación ductal durante el desarrollo normal de la glándula mamaria, y una forma constitutivamente activa de Notch4 en células epiteliales mamaras inhibe la diferenciación epitelial y da por resultado tumorigénesis (Jhappan *et al.*, 1992, *Genes & Dev.* 6:345-5; Gallahan *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:1775-85; Smith *et al.*, 1995, *Cell Growth Differ.* 6:563-77; Soriano *et al.*, 2000, *Int. J. Cancer* 86:652-9; Uyttendaele *et al.*, 1998, *Dev. Biol.* 196:204-17; Politi *et al.*, 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Se proporciona evidencia para un papel para Notch en cáncer de mama de humano por los datos que muestra la expresión de receptores Notch en carcinomas de mama y su correlación con resultado clínico (Weijzen *et al.*, 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr *et al.*, 2004, *Int. J. Mol. Med.* 14:779-86). Adicionalmente, la sobreexpresión de la ruta Notch se ha observado 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 endometriales (Suzuki *et al.*, 2000, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9), y neuroblastomas (van Limpt *et al.*, 2000, *Med. Pediatr. Oncol.* 35:554-8), sugerente de un papel potencial de Notch en el desarrollo de varios neoplasmas. De manera interesante, la señalización Notch puede jugar un papel en el mantenimiento del estado no diferenciado de células neoplásticas mutantes de Apc del colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends in Mol. Med.* 11:496-502).
- La ruta Notch también está comprendida en múltiples aspectos del desarrollo vascular que incluyen proliferación, migración, diferenciación del músculo liso, angiogénesis y diferenciación arterial-venosa (Iso *et al.*, 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:543). Por ejemplo, las mutaciones nulas homocigotas en Notch1/4 y Dentado1 así como la pérdida heterocigota de DLL4 da por resultado defectos severos hasta variables en el desarrollo arterial y vascularización del saco vitelino. Adicionalmente, embriones de ratón, hipomórficos de Notch2 y deficientes DLL1 muestran hemorragia que probablemente resulta el pobre desarrollo de las estructuras vasculares (Gale *et al.*, 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs *et al.*, 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue *et al.*, 1999, *Hum. Mol. Genet.* 8:723-30; Hrabe de Angelis *et al.*, 1997, *Nature* 386:717-21; McCright *et al.*, 2001, *Dev.* 128:491-502). En humanos, se asocian las mutaciones en Dentado1 con el síndrome de Alagille, un trastorno de desarrollo que incluye defectos vasculares, y las mutaciones en Notch3 son responsables de demencia vascular heredada (Cadasil) en la cual es defectuosa la homeostasis de los vasos (Joutel *et al.*, 1996, *Nature* 383:707-10).

Anteriormente se han reportado anticuerpos Anti-Notch y su posible uso como productos terapéuticos anti-cáncer. Ver, por ejemplo, Publicación de solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2008/0131434. Ver también, Publicaciones Internacionales Nos. WO 2008/057144 y WO 2008/076960, así como publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 2008/0226621, 2008/0118520, y 2008/0131908.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados que se unen de manera específica a Notch2 y Notch3 humano, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En ciertas modalidades, los anticuerpos se unen a una región del receptor Notch que está fuera del dominio de unión al ligando (por ejemplo EGF10 de Notch2 o EGF9 de Notch3). También se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, como son vectores que comprenden los polinucleótidos. Además se proporcionan células que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención. También se proporcionan composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden los nuevos antagonistas Notch. También se describen en el presente documento métodos para usar los agentes y antagonistas, tal como métodos para usar los antagonistas Notch para inhibir el crecimiento tumoral, para reducir la tumorigenicidad de tumores, para inhibir la angiogénesis y/o para tratar cáncer u otras enfermedades asociadas con la angiogénesis.

Se describe en el presente documento un agente que inhibe la unión de un ligando a Notch2 y/o Notch3 humano. El agente puede inhibir la unión de un ligando a Notch2 humano. El agente puede inhibir la unión de un ligando a Notch2 y Notch3. El agente inhibe la unión de un ligando a Notch3. El ligando puede ser DLL4, JAG1 o JAG2. El agente puede inhibir la señalización de Notch2 y/o Notch3 humano. El agente inhibe la señalización de Notch2 humano. El agente inhibe la señalización de Notch2 y Notch3. El agente puede inhibir la señalización de Notch3. Se puede inducir la señalización de Notch2 y/o Notch3 por DLL4, JAG1 o JAG2. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el agente y métodos para usar el agente para estos usos tal como la inhibición de la angiogénesis, la inhibición del crecimiento celular, la reducción de la tumorigenicidad de un tumor, y/o el tratamiento de cáncer.

La invención proporciona un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEC ID Nº: 5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEC ID Nº: 6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEC ID Nº: 51); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEC ID Nº: 8); una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEC ID Nº: 9), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEC ID Nº: 10). También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos tales como inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor y/o tratar el cáncer.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente con Notch2 y Notch3, en el que el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEC ID Nº: 5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEC ID Nº: 6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEC ID Nº: 7); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEC ID Nº: 8), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEC ID Nº: 9), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEC ID Nº: 10). También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos para inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEC ID Nº: 5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEC ID Nº: 6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende (G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEC ID Nº: 30); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEC ID Nº: 8), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEC ID Nº: 9), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEC ID Nº: 10). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYPT (SEC ID Nº: 22). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSSFFAS (SEC ID Nº: 23). En otras modalidades, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSFYAS (SEC ID Nº: 24). En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSFFAT (SEC ID Nº: 25). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYPS (SEC ID Nº: 26). En aún otras modalidades, el anticuerpo comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende SSFFAN (SEC ID Nº: 27). También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos tal como inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor y/o tratar cáncer.

También se describe un polipéptido (por ejemplo, una región variable de cadena pesada) que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 57, o SEC ID N°: 20 (con o sin secuencia de señal); y/o (b) un polipéptido (por ejemplo, una región variable de cadena ligera) que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 19 o SEC ID N°: 39 (con o sin secuencia de señal). El polipéptido puede ser un anticuerpo. El polipéptido puede unirse de manera específica a Notch2 y/o Notch3 humano. El polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 13, o SEC ID N°: 50. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido y métodos para usar el polipéptido para usos tal como inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer.

También se describe un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo) que comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 16, o SEC ID N°: 2 (con o sin secuencia de señal); y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 18, o SEC ID N°: 4 (con o sin secuencia de señal). El polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 39 o SEC ID N°: 40. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos para tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

También se describe un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o una cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo) que comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 50; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 13. El polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 50 o SEC ID N°: 13. El polipéptido puede ser un anticuerpo que se une a Notch2 humano y/o Notch3 humano. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos para tratar cáncer que comprenden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los anticuerpos.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende, consiste, o consiste esencialmente de un anticuerpo IgG2 59R1 que comprende la cadena pesada y cadena ligera de SEC ID N°s: 16 y 18 (con o sin secuencia de señal), respectivamente, o como se codifica por el ADN depositado con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, EUA, bajo las condiciones del tratado de Budapest el 15 de Octubre del 2008, y el número de designación PTA-9547 asignado. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos tal como inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que comprende, consiste o consiste esencialmente de un anticuerpo IgG2 59R5 que comprende la cadena pesada y cadena ligera de SEC ID N°: 49 y SEC ID N°: 18 (con o sin secuencia de señal), respectivamente, o como se modifica por el ADN depositado con la ATCC el 6 de Julio de 2009, y el número de designación asignado PTA-10170. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos tal como inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o tratar cáncer.

También se describe un anticuerpo que compite para la unión específica a Notch2 y/o Notch3 humano con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 13. El anticuerpo puede competir para la unión específica con un anticuerpo IgG2 59R1 que comprende la cadena pesada y cadena ligera de SEC ID N°s: 16 y 18 (con o sin secuencia de señal), respectivamente, o como se codifica por el ADN depositado con la ATCC el 15 de Octubre de 2008, y con el número de asignación PTA-9547, asignado. El anticuerpo puede competir para la unión a Notch2 humano. Puede competir para la unión a Notch2 y Notch3 humano. Puede competir para la unión a Notch3 humano. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos tal como inhibir la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor, y/o para tratar cáncer.

También se describe un anticuerpo que compite para la unión específica a Notch2 y/o Notch3 humano con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N°: 50 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N°: 13. El anticuerpo puede competir para la unión específica con un anticuerpo 59R5 que comprende la cadena pesada y cadena ligera de SEC ID N°s: 49 y 18, respectivamente, o como se codifica por el ADN depositado con la ATCC el 6 de Julio del 2009, y el número de designación asignado PTA-10170. El anticuerpo puede competir para la unión a Notch2 humano. Puede competir para unión a Notch2 y Notch3 humano. Puede competir para la unión a Notch3 humano. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y métodos para usar el anticuerpo para usos tal como inhibir la

angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la tumorigenicidad de un tumor y/o tratar cáncer.

También se describe un polipéptido (con o sin una secuencia de señal) que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, y SEC ID N°: 57, así como un polinucleótido que codifica para este polipéptido. El polipéptido puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse de manera específica a Notch2 humano y/o Notch3 humano. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 48, SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 59 y SEC ID N°: 60.

También se describe un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto. El método puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Notch2 humano y/o Notch3 humano. El antagonista puede ser un anticuerpo descrito en una cualquiera de los aspectos y/o modalidades mencionadas anteriormente, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en la presente. El tumor puede comprender una delección u otra mutación en el gen de fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN). El tumor puede ser un tumor de mama.

También se describe un método para seleccionar un sujeto para tratamiento con un antagonista de Notch2 humano y/o Notch3 humano. El método puede comprender (a) determinar si el tumor comprende una supresión o mutación en el gen del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN); y (b) seleccionar el sujeto para tratamiento con un antagonista de Notch2 y/o Notch3 si el tumor comprende la supresión o mutación. El sujeto se puede tratar con un antagonista de Notch2. El sujeto se puede tratar con un antagonista de Notch2 y Notch3. El sujeto se puede tratar con un antagonista de Notch3. El antagonista puede ser un anticuerpo. El tumor puede ser un tumor de mama.

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos o modalidades mencionadas anteriormente, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en otra parte de la presente, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es monovalente, bivalente o multivalente. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. En ciertas modalidades, un sitio individual de unión al antígeno del anticuerpo se une (o es capaz de unirse) a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de Notch2 y Notch3. En ciertas modalidades alternativas, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo tipo IgG1. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo tipo IgG2. En ciertas modalidades, el anticuerpo se conjuga a una porción citotóxica. En ciertas modalidades, el anticuerpo está aislado. En aún modalidades adicionales, el anticuerpo es sustancialmente puro.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser para su uso en el tratamiento de cáncer o un tumor, en el que el cáncer o tumor tratado con el anticuerpo es un tumor o cáncer de mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, de próstata, o de cabeza y cuello. En ciertas modalidades, el cáncer o tumor es melanoma. En ciertas modalidades, el cáncer o tumor es un tumor o cáncer de mama. En ciertas modalidades, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor colorrectal. En ciertas modalidades, el cáncer o tumor es un tumor o cáncer pancreático. En ciertas modalidades, el cáncer o tumor es un cáncer de tumor o próstata.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que los métodos para tratar cáncer comprenden inhibir el crecimiento tumoral. En ciertas modalidades, los métodos para tratar cáncer comprenden reducir la tumorigenicidad de los tumores (por ejemplo, al reducir la frecuencia de las células madre de cáncer en el tumor).

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos o modalidades mencionadas anteriormente, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en otra parte de la presente, el anticuerpo es para administración a un sujeto en combinación con un tratamiento adicional para cáncer. En ciertas modalidades, el tratamiento adicional para cáncer comprende terapia de radiación, quimioterapia, y/o un producto terapéutico de anticuerpo adicional. En algunas modalidades, el tratamiento adicional para cáncer comprende un agente quimioterapéutico. En ciertas modalidades, la quimioterapia comprende paclitaxel (por ejemplo, TAXOL), irinotecan, gemcitabina, y/o oxaliplatina. En ciertas modalidades, el producto terapéutico de anticuerpo adicional es un anticuerpo que se une de manera específica a un receptor Notch humano (por ejemplo, Notch1, 2, 3, o 4) o un ligando de receptor Notch humano (por ejemplo, DLL4 o JAG1). En algunas modalidades, el producto terapéutico de anticuerpo adicional es un anticuerpo anti-DLL4. En ciertas modalidades alternativas, el producto terapéutico de anticuerpo adicional es un anticuerpo que se une de manera específica al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF). En ciertas modalidades, el producto terapéutico adicional se une al receptor de VEGF.

En ciertas modalidades de cada uno de los aspectos o modalidades adicionales, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en otra parte de la presente, el anticuerpo es para administración a un sujeto en combinación con un segundo agente terapéutico que es un agente anti-angiogénico.

Adicionalmente, mediante la invención se proporcionan líneas celulares (por ejemplo, líneas de células de hibridoma) que comprende o que producen los anticuerpos u otros polipéptidos descritos en la presente. También se proporcionan polinucleótidos (por ejemplo, vectores) que comprenden los polinucleótidos descritos en al presente, incluyendo los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos o las regiones variables de cadena ligera o regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos descritos en la presente, como lo son líneas celulares que comprenden estos polinucleótidos.

También se describe un método para tratar cáncer, en donde el cáncer comprende células madre de cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a un receptor Notch. En un aspecto más particular, se describe un método para tratar cáncer, en donde el cáncer comprende células madre que expresan uno o más miembros de la familia de receptores Notch que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a estos miembros de la familia de receptores Notch. La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a un dominio de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano receptor y son terapéuticamente efectivos contra cáncer. De esta manera, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando el dominio extracelular de un receptor Notch humano y que inhibe el crecimiento tumoral. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona además dichos anticuerpos para uso en un método para tratar cáncer, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de una proteína de receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral.

En la presente se contemplan varias ventajas al usar un anticuerpo que se une a los miembros de la familia de receptores Notch o los ligandos a estos receptores Notch para tratar cánceres. En algunas modalidades, ciertos receptores Notch se expresan altamente en ciertos tumores sólidos, por ejemplo, mama y colon, y esto proporciona una cavidad para el fármaco activo 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.

También se describe un método para tratar cáncer en un humano, en donde el cánceres que comprende células madre de cáncer no está caracterizado por la sobre-expresión por la célula madre de cáncer de uno o más receptores Notch, que comprende administrar al humano una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a un receptor Notch y bloquea la activación por ligando de un receptor Notch.

También se describe un método para tratar cáncer en un humano que comprende administrar al humano cantidades terapéuticamente efectivas de (a) un primer anticuerpo que se une a un receptor Notch e inhibe el crecimiento o proliferación de células madre de cáncer que sobreexpresan receptores Notch; y (b) un segundo anticuerpo que se une a un receptor Notch y bloquea la activación por ligando de un receptor Notch.

También se describe un método para tratar cáncer, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de mama, colon, rectal y colorrectal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a Notch. También se describe otro método para tratar cáncer, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de mama, de colon, pancreático, de próstata, de pulmón, rectar y colorrectal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor Notch. También se describe aún otro método para tratar cáncer, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de mamas, de colon, pancreático, de próstata, de pulmón, rectal y colorrectal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva en un anticuerpo que se une a Notch y un anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor Notch.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica para cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de los aspectos o modalidades mencionadas anteriormente, así como otros aspectos y/o modalidades descritas en otra parte de la presente. En algunas modalidades, la invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En algunas modalidades, una célula hospedera comprende el polinucleótido o el vector. En otras modalidades, un proceso para producir el anticuerpo comprende cultivar una célula hospedera que comprende el polinucleótido de modo que se exprese al polinucleótido, y opcionalmente, comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de células hospederas (por ejemplo, el medio de cultivo de células hospederas).

Además, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica para un anticuerpo humano o humanizado como se describe en las modalidades o aspectos mencionados anteriormente, así como se describe en otra parte de la presente; un vector que comprende el polinucleótido; una célula hospedera que comprende el polinucleótido o el vector; así como un proceso para producir el anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedera que comprende el polinucleótido de modo que se exprese el polinucleótido, y opcionalmente, comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de células hospederas (por ejemplo, el medio de cultivo de células hospederas).

Donde los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otro agrupamiento de alternativas, incluyendo, pero no limitado a, grupos de alternativas separadas por "y/o" u "o," la presente invención abarca no solo el grupo completo listado como una totalidad, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el grupo principal ausente uno o

más de los miembros del grupo. La presente invención también contempla la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo de la invención reivindicada. Por ejemplo, la redacción tal como "X y/o Y" expresa "X" de manera individual, "Y" de manera individual, así como "X" e "Y" conjuntamente.

5 Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Anticuerpos 59R1 y variantes se unen a Notch2 humano y bloquean la unión a ligando. Figura 1A análisis por FACS de la unión por Fab 59R1 a Notch2 humano. "Clon 1" es Fab 59R1 que se mostró que se une a Notch2 humano en células HEK293 establemente transfectadas. "Clon 5" es el Fab de un clon diferente aislado de la biblioteca de fagos que no se une a Notch2. Figura 1B análisis por FACS del bloqueo de la unión a ligando (JAG1) por Fab 59R1. "Clon 1" es Fab 59R1 que se mostró que bloquea la unión de una fusión hndentado1 ECD-Fc a Notch2 humano en células HEK293 establemente transfectadas. "Clon 5" es el Fab de un clon diferente aislado de la biblioteca de fagos que no bloquea la unión a ligando en el ensayo. Figura 1C análisis por FACS de la unión del anticuerpo IgG2 59R1 a Notch2 humano en células HEK293 establemente transfectadas. El anticuerpo IgG2 59R1 se mostró que se une a Notch2 humano en células HEK293 establemente transfectadas. Figura 1D análisis por FACS de bloqueo de unión a ligando (DLL4) por anticuerpo IgG2 59R1. Se mostró que el anticuerpo IgG2 59R1 bloquea la unión de una fusión hDLL4 ECD-Fc a Notch2 humano en células HEK293 establemente transfectadas. Figura 1E estrategia de maduración por afinidad para CDR3 de cadena pesada de 59R1. La secuencia parental de la CDR3 de cadena pesada de 59R1 se muestra en cuadro. Los cambios de residuo permitidos son como se indica más adelante de la secuencia parenteral en la figura. Figura 1F examen de las secuencias de 59R1 maduras por afinidad para la capacidad de bloqueo de JAG1. Las variantes mejoradas se indican con flechas.

Figura 2: análisis por FACS de reactividad cruzada del anticuerpo IgG2 59R1 de los cuatro homólogos Notch humanos. Se encontró que 59R1 se une a hNotch2 hNotch3 en células HEK-293 transcientemente transfectadas pero se encontró que no exhibe unión significativa a hNotch1 y hNotch4 en las mismas células.

Figura 3: correlación de epítomos de anticuerpos 59R1. (Figura 3A) anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 se une a la repetición 10 de EGF de Notch2 humano. El sobrenadante de células HEK 293 que expresan proteínas de fusión de Notch2-Fc recombinantes con las repeticiones se EGF indicadas de Notch2 entre 1 y 12 (eje x) se usaron con ELISA con anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3. El OD (eje y) indicó la unión a anticuerpo (barras plumeadas) solo a proteínas de fusión de Notch2 que comprende la repetición 10 de EGF. (La figura muestra datos obtenidos de dos experimentos separados que se muestran de manera separada en las gráficas superior y de fondo). (Figura 3B) las repeticiones 11 y 12 de EGF no están comprendidas en el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 que se une a hNotch2 de longitud completa. Análisis por FACS de células HEK 293 transfectadas con proteína fluorescente verde (GFP) (eje x) sola (parte superior izquierda) o co-transfectadas con GFP y ya sea Notch2 intacto de longitud completa o con Notch 2 de longitud completa con la repetición 11 de EGF suprimida (Δ EGF11) o la repetición 12 de EGF suprimida (Δ EGF12). La unión de 59R1 se indica a lo largo del eje y (PE) para las tres proteínas Notch2 en células que expresan GFP. (Figura 3C) la repetición 10 de EGF está comprendida en el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 que se une a hNotch2 de longitud completa, pero no en la unión a ligando. La unión por un anticuerpo 59M70 anti-Notch2 que se une a EGF 1-4 de hNotch2 se indica como "unión anti-Notch2". La unión por DLL4 se indica como "unión a ligando".

Figura 4: Anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3 inhibe la señalización de Notch2 en ensayos de indicador de luciferasa. (Figura 4A) 59R1 bloquea actividad de indicador de Notch2 inducida por hDLL4. (Figura 4B) 59R1 bloquea actividad de indicador de Notch2 inducida por hJAG1. (Figura 4C) 59R1 bloquea la actividad de indicador de Notch2 inducida por hJAG2

Figura 5: Anticuerpo 59R1 de receptor Notch2/3 inhibe la formación y crecimiento tumoral *in vivo*. (Figura 5A) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe la formación de tumores de mama PE13. Se trataron ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama PE13 con el anticuerpo de control (cuadrado) o el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (triángulos abiertos) dos días después de la inyección de las células y se midió el volumen tumoral (eje y, mm^3) a través del tiempo (eje x, días después de la inyección de las células). El tratamiento con los anticuerpos 59R1 inhibió de manera significativa la formación tumoral en comparación al control., ($p < 0.001$). (Figura 5B) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe la Formación de Tumores de Mama T3. Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama T3 se trataron con el anticuerpo de control (cuadrado) o el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (triángulos abiertos) dos días después de la inyección de células, y se midió el volumen tumoral (eje y, mm^3) a través del tiempo (eje x, días después de inyección de células). El tratamiento con los anticuerpos 59R1 inhibió de forma significativa la formación tumoral en comparación al control. ($p < 0.001$). (Figura 5C) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de Tumores de Colon Colo-205. Ratones hembra *bg/nu XID* inmunodeficientes de 6-8 semanas de edad en antecedente Swiss CD-1 inyectados con células de tumor de colon Colo-205 se trataron con el anticuerpo de control (cuadrados) o el 59R1 anti-Notch2/3 (diamantes) después que el volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 a 200 mm^3 . Se midió el volumen tumoral medio (eje y, mm^3) a través del tiempo (eje x, días después de inyección de células). El tratamiento con anticuerpo 59R1 el crecimiento tumoral en comparación al control (** $p < 0.001$ después del día 40). (Figura 5D) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de Tumores Pancreáticos PN4. Ratones NOD/SCID inyectados con células tumorales pancreáticas PN4 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (diamantes) después de que el volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 a 200 mm^3 . Se midió el volumen tumoral medio (eje y, mm^3) a través del tiempo (eje x, días después de inyección celular). El tratamiento con los anticuerpos 59R1 inhibió el crecimiento tumoral en comparación al control (** $p < 0.001$ después del día 70). (Figura 5E) Anti-Notch2/3

(59R1) Inhibe el crecimiento de tumores de mama PE13. Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama PE13 se trataron con anticuerpo de control (cuadrados) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (diamantes) después de que el volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 a 200 mm³. Se midió el volumen tumoral medio (eje y, mm³) a través del tiempo (eje x, días después de la inyección celular). El tratamiento con anticuerpo 59R1 inhibió el crecimiento tumoral en comparación al control (* p < 0.05 después del día 57). (Figura 5F) Anti-Notch2/3 (59R1) Inhibe el Crecimiento de Tumores de Mama T3. Ratones NOD/SCID inyectados con células de tumor de mama T3 se trataron con anticuerpo de control (barras sólidas) o anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 (barras abiertas) después de que el volumen tumoral alcanzó un tamaño entre 65 a 200 mm³. El volumen tumoral medio se midió en los días 18, 25, 39, y 42 después de la inyección de las células. El tratamiento con anticuerpo 59R1 inhibió el crecimiento tumoral en comparación al control (***) p < 0.001 en el día 42).
 Figura 6: Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 retrasa la recurrencia de tumor de mama B51 después del tratamiento con paclitaxel.
 Figura 7: Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 disminuye la frecuencia de células madre de cáncer en tumor de mama B51.
 Figura 8: En combinación con gemcitabina, el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe el crecimiento de tumores pancreáticos PN4.
 Figura 9: anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de melanoma M4.
 Figura 10: Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 inhibe el crecimiento de tumores de colon C28 solo y en combinación con irinotecano.
 Figura 11: Anticuerpo 59R1 tipo IgG2 inhibe de forma significativa el crecimiento tumoral de xenoinjertos establecidos de tumor humano *in vivo*. Los tumores establecidos de Colo-205 (Figura 11A), C8 (Figura 11B), PN8 (Figura 11C), B34 (Figura 11D), B39 (Figura 11E), B44 (Figura 11F), PE-13 (Figura 11G) y T1 (Figura 11H) (s.c, n=10 por grupo) se trataron a 15 mg/kg una vez a la semana con los anticuerpos indicados (1B711, anticuerpo de control LZ-1, cuadros negros; 59R1, triángulos negros; AVASTIN, círculos negros; AVASTIN + 59R1, diamantes negros). El volumen tumoral (eje x) se graficó con respecto al tiempo (eje y). En el modelo de xenoinjerto Colo-205, la terapia de combinación de 59R1 con AVASTIN fue significativamente más efectiva que ya sea el tratamiento con anticuerpo solo. En las Figuras 11B-11H, los asteriscos indican inhibición significativa del crecimiento tumoral en el día mostrado: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001, prueba t de Student; Símbolos, media; barras, SEM.
 Figura 12: Niveles de expresión relativa de genes seleccionados se regulan de forma significativa por tratamiento con 59R1 en varios modelos de tumor de xenoinjerto. Los niveles de expresión de HEYL (Figura 12A), Notch3 (Figura 12B), RGS5 (Figura 12C), ANGPT1 (Figura 12D) y ANGPT2 (Figura 12E) se probaron de manera individual por análisis TaqMan^{MR} de modelos de xenoinjerto anteriormente probados. De forma notable, la carencia de estrógeno (ne) anula el efecto de 59R1 al reducir la expresión de ANGPT1 y ANGPT2 en el estroma hospedero de ratones que tienen T1. Los círculos abiertos corresponden a tumores individuales analizados. Línea horizontal, media.
 Figura 13: El gen PTEN supresor tumoral se suprime en muchos de los tumores de mama en los cuales 59R1 mostró eficiencia anti-tumor. Se muestran el exón PTEN, la distribución de la sonda Affymetrix, y las supresiones en el gen PTEN en el cromosoma 10. Las barras gruesas y delgadas coloreadas en gris indican las supresiones homocigotas y heterocigotas de los fragmentos cromosómicos, respectivamente.
 Figura 14. Con relación de epítomos de anticuerpo 59R1. (Figura 14A) alineación de proteína de homólogos Notch humanos. La alineación se realizó por el Software Clone Manager. La repetición 10 de EGF de Notch1, Notch2, y Notch4 humano y el EGF equivalente en Notch3 humano, EGF9, es como se indica. El área en el cuadro indica una región que contiene uno o más aminoácidos que constituyen al menos parte del epítopo 59R1 como se define por la unión de FACS del anticuerpo IgG2 59R1 a un mutante hNotch2 H385N AL388-89 SN (Figura 14B) y a una construcción hNotch1 en la cual se ha mutado aa 382-386 para corresponder a la secuencia de hNotch2 (Figura 14C). (Figura 14B) el anticuerpo IgG2 59R1 se une a hNotch2, pero no a hNotch2 mutante en el cual se han mutado ciertos residuos de EGF 10 a residuos de hNotch1 (H385N AL 388-89 SN). (Figura 14C) el anticuerpo IgG2 59R1 no se une a hNotch1, sino que se une a un hNotch1 mutante en el cual se han mutado ciertos residuos de EGF 10 (aa 382-387) para corresponder a los residuos 385-389 de hNotch2.
 Figura 15. Caracterización *in vitro* de 59R5. (Figura 15A) la Figura 15A muestra que el anticuerpo 59R5 es capaz de bloquear la señalización inducida por ligando de Notch2 y Notch3. Se transfectaron de manera transciente células tumorales PC3 con el receptor Notch humano o de ratón (hN2, Notch2 humano; mN2, Notch2 murino; hN3, Notch3 humano; mN3, Notch3 murino) y construcción indicadora inducible por GFP. Las células transfectadas se incubaron con diferentes concentraciones del anticuerpo 59R1 y 59R5 en la presencia de DLL4-Fc pasivamente inmovilizado. (Figura 15B) la Figura 15B muestra que 59R5 se une a un epítopo similar como 59R1. Células HEK 293 se transfectaron de manera transciente con vectores de expresión que codifican para Notch2 humano, Notch1 humano, o Notch1 humano con los residuos 382-386 mutados a los residuos correspondientes de Notch2 humano. También se co-transfectaron células con un plásmido que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) para marcar aquellas células que recibieron el plásmido transfectado. Las células se incubaron con 59R1 o 59R5 y anticuerpo secundario fluorescente luego se examinaron por FACS. Las regiones resaltadas por los cuadros sugieren que las células transfectadas con el vector de expresión Notch indicado fueron capaces de unirse a 59R1 o 59R5.
 Figura 16. El anticuerpo 59R5 de receptor Notch inhiben la formación y crecimiento tumoral *in vivo*. La Figura 16A muestra el tratamiento *in vivo* de células de tumor de mama de PE13 con el anticuerpo 59R5. La Figura 16B

muestra el tratamiento *in vivo* en células de colón C28 con el anticuerpo 59R5. La Figura 16C muestra el tratamiento *in vivo* de células de colón Colo205 con el anticuerpo 59R5.

Figura 17. Tratamiento *in vivo* usando anticuerpo 59R5 Notch2/3 en tratamiento de combinación. (Figura 17A).

Se inyectaron ratones con células de tumor pancreático PN8 se dejaron crecer los tumores durante 33 días hasta que alcanzaron un volumen promedio de 120 mm³. Los animales se trataron con gemcitabina a 20 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas en combinación con ya sea Ab de control (cuadrados), 59R1 (triángulos), o 59R5 (círculos). (Figura 17B) Los ratones se inyectaron con células de tumor de mama PE13 los tumores se dejaron crecer durante 40 días antes de que se iniciaran los tratamientos. Los animales se trataron con TAXOL a 15 mg/kg dos veces por semana durante 5 semanas, más ya sea el anticuerpo de control (cuadrados) o 59R5 (círculos). Después de 5 semanas, se detuvieron los tratamientos con TAXOL y los tratamientos con anticuerpo se continuaron.

Figura 18. Regulación de la expresión génica en tumores después de tratamiento con anticuerpo 59R5. La Figura 18 muestra los niveles de expresión de genes seleccionados en células del estroma y genes humanos seleccionados en células tumorales PE 13 después del tratamiento con 59R1, 59R5, o anticuerpo de control.

Figura 19. Reducción de frecuencia de células madre de cáncer de mama PE13 por 59R1. (Figura 19A) Se

trataron tumores establecidos con el anticuerpo de control, taxol más anticuerpo de control, 59R1, o taxol más 59R1. Se recolectaron los tumores después de tres semanas de tratamiento, se procesaron y titulaciones en serie de células humanas de cada uno de los cuatro grupos de tratamiento se trasplantaron a un nuevo conjunto de ratones (n =10 por dosis de células). Se determinó la velocidad de crecimiento tumoral después de 75 días.

La velocidad de crecimiento tumoral después de 75 días de crecimiento se usó para calcular la frecuencia de CSC usando el programa L-calc (Stem Cell Technologies, Inc.). (Figura 19B) Frecuencia de células madre de cáncer en tumores de mama PE 13 después del tratamiento con 59R1 y/o taxol. (Figura 19C) Frecuencia de células madre de cáncer en tumores pancreáticos PN4 después de tratamiento con 59R1 y/o gemcitabina.

(Figura 19D) Frecuencia de células madre de cáncer en tumores de mama PE13 después del tratamiento con 59R5 y/o taxol. Un asterisco individual indica una diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) versus el grupo tratado con anticuerpo de control y un doble asterisco indica una diferencia significativa versus el grupo tratado con taxol y el anticuerpo de control.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos, que se unen a receptores Notch humanos, Notch2 y Notch3. Los agentes que se unen a Notch incluyen antagonistas de los receptores Notch humanos. También se describen polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los agentes de unión a Notch y métodos para producir los agentes a unión a Notch. Además se describen métodos para usar los nuevos agentes de unión a Notch, tal como métodos para inhibir el crecimiento tumoral, para inhibir la angiogénesis, y/o para tratar cáncer u otras enfermedades relacionadas a la angiogénesis.

La presente invención identifica anticuerpos que se unen de manera específica a una región de no unión a 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 necesario y suficiente para la unión a ligando, se ha identificado como repeticiones 11 y 12 de EGF, sugiriendo que esta región del receptor Notch es importante en la señalización Notch y en la tumorigénesis (Rebay *et al.*, 1991, Cell 67:687; Lei *et al.*, 2003, Dev. 130:6411; Hambleton *et al.*, 2004, Structure 12:2173). De manera inesperada, se ha encontrado que los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión a ligando del dominio extracelular de receptor Notch humano inhiben el crecimiento de células tumorales *in vivo* (ver Publicación de Patente de los Estados Unidos N^o 2008/0131434). De esta manera, los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión a ligando del dominio extracelular de uno o más de los receptores Notch humanos Notch1, Notch2, Notch3, y Notch4 tienen valor como productos terapéuticos potenciales para el cáncer.

Ahora se ha identificado un anticuerpo que se une de manera específica a un epítipo que contiene residuos dentro de la repetición 10 de EGF de Notch2 humano (Ejemplos 1 y 3 y Figuras 3A-3C). El anticuerpo, 59R1, inhibe la unión de ligando a Notch2 (Ejemplo 1 y Figuras 1A-1D) e inhibe la señalización de Notch2 inducida por ligando (Ejemplo 4 y Figuras 4A-4C), a pesar de unirse a Notch2 en una región fuera de la región de unión a ligando. 59R1 también se une de manera específica a Notch3 humano (Ejemplo 2 y Figura 2). Se ha encontrado que el anticuerpo previene o inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo* en varios modelos diferentes de xenoinjerto, ya sea solo o en combinación con un segundo agente anti-cáncer (Ejemplos 5, 6, 7, y 9 y Figuras 5A-F, 6, 8- 10, y 11A-H). También se ha mostrado que el anticuerpo reduce la tumorigenicidad de un tumor *in vivo* en múltiples modelos de xenoinjerto al reducir la frecuencia de células madre de cáncer (Ejemplos 8 y 23 y Figuras 7 y 19A-C). Además, se encontró que el tratamiento con 59R1 reduce la expresión de RGS5 (un marcador para pericitos y/o células del músculo liso y/o células del músculo liso vascular), Notch3, y HeyL en el estroma de varios tumores (Ejemplo 10 y Figuras 12 A-E) y favorece la expresión de hipoxia en tumores de mama y colón (Ejemplo 11). Sin que se desee que se una por teoría, estos datos indican que el anticuerpo 59R1 tiene un efecto inhibitorio en la angiogénesis tumoral que es debida a menos en parte, a la modulación de la función de pericitos y/o células del músculo liso vascular. También se encontró que el tratamiento con 59R1 regula genes adicionales en tumores de mama. Se encontró que las rutas de los genes del ciclo celular, los genes activadores de myc y varios conjuntos de genes de células madre se reducen en expresión por 59R1 (Ejemplo 22).

También se ha desarrollado un anticuerpo humano adicional 59R5. 59R5 tiene propiedades que son similares a 59R1, tal como afinidad similar de unión a Notch2 y Notch3 y similitudes o traslapes en sus epítomos (Ejemplo 13 y Figura 15B). Se ha mostrado que el anticuerpo 59R5 tiene actividad similar como 59R1 al bloquear la señalización de Notch2 y Notch3 (Ejemplo 13 y Figura 15A). El anticuerpo 59R5 también se ha mostrado que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en varios modelos en injerto, ya sea solos o en combinación con un segundo agente anti-cáncer. Ejemplos 14 y 15 Figuras 16A-16C y 17A-17B). Además, se encontró que el tratamiento con 59R5, al igual que 59R1, reduce la expresión de RGS5, Notch3, y HeyL en el estroma de varios tumores, y también se encontró que 59R5 regula la expresión de los genes humanos ID4, EDNRA, y EGLN3 en células tumorales a un grado similar como 59R1 (Ejemplo 16). Además, se mostró que 59R5 reduce la tumorigenicidad *in vivo* en un modelo de xenoinjerto al reducir la frecuencia de células madre de cáncer (Ejemplo 23 y 19D).

Definiciones

Un “antagonista” de un receptor Notch es un término que incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza de manera parcial o completa una actividad biológica de la ruta Notch. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen de manera específica anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpo.

El término “anticuerpo” se usa para querer decir una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une de manera específica a un objetivo o diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de lo anterior, etcétera, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tal como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), mutantes de Fv de cadena individual (scFv), anticuerpos multiespecíficos tal como anticuerpos biespecíficos generados de al menos dos anticuerpos intactos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno en tanto que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basadas en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, epsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferentes y bien conocidas estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden estar expuestos o estar conjugados a otras moléculas tal como toxinas, radioisótopos, etcétera.

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

Un “anticuerpo de Fv” se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno ya sea como dos cadenas, en las cuales un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera forma un dímero covalente, o como una cadena individual (scFv), en el cual un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera se enlazan covalentemente por un ligador peptídico flexible de modo que las dos cadenas se asocien en una estructura dimérica similar. En esta configuración, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir la especificidad de unión a antígeno del dímero de Fv. De manera alternativa, se puede usar un dominio variable individual (o la mitad de un Fv) para reconocer y unirse al antígeno, aunque en general con menor afinidad.

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

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) que son cadenas específicas de inmunoglobulina, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de los mismos que contiene secuencias no humanas mínimas. Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales se reemplazan residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster, etcétera) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad, deseadas. En algunos casos, los residuos de la región menos variable (FR) de Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado se

puede modificar adicionalmente por la sustitución del residuo adicional ya sea en la región menos variable de Fv y/o dentro de 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 al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana en tanto que todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.225.539.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a una región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten en cada una de cuatro regiones menos variables (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas, regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen conjuntamente en proximidad cercana por las FR y con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Hay al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un planteamiento basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un planteamiento basado en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazkani *et al* 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948)). Además, en la técnica, para determinar las CDR se usan algunas veces combinaciones de estos dos planteamientos.

El término "anticuerpos humanos" como se usa en la presente, significa un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano producido usando cualquiera de las técnicas conocidas. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos de intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos murinos de cadena ligera y humanos de cadena pesada.

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

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de tanto las cadenas ligeras como pesadas 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, en tanto que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otra (usualmente humano) para evitar producir una respuesta inmunitaria en esa especie.

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

La competición entre anticuerpos se determina por un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo estudio 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 de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de intercalación (ver Stahli *et al.*, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA de biotina-avidina, directo, de fase sólida (ver Kirkland *et al.*, J. *Immunol.* 1986, 137:3614-3619); ensayo marcado, directo, de fase sólida, ensayo de intercalación, marcado, directo, de fase sólida (ver Harlow y Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA de marca directa usando marca I-125 (ver Morel *et al.*, 1988, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15); EIA de biotina-avidina, directo de fase sólida (Cheung *et al.*, 1990, *Virology* 176:546-552); y RIA marcado, directo (Moldenhauer *et al.*, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Normalmente, este ensayo comprende el uso de antígeno purificado, unido a una superficie sólida o células que tienen cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide al determinar la cantidad de marca unida a la superficie sólida o a células en la presencia de la inmunoglobulina de la prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximos al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se presente el impedimento estérico. Usualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común por menos 50 o 75 %.

Que un anticuerpo “se une de forma selectiva” o “se une de manera específica” 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 lo anterior al epítipo receptor que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. “Se une de manera selectiva” o “se une de manera específica” significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con un K_D de aproximadamente 0,1 μM o menos, más usualmente aproximadamente 1 μM o menos. “Se une de manera selectiva” o “se une de manera específica” significa en momentos que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D de aproximadamente 0,1 mM o menos, a veces aproximadamente 1 μM o menos, a veces aproximadamente 0,1 μM o menos, a veces aproximadamente 0,01 μM o menos, y a veces aproximadamente 1 nM o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce un receptor Notch en más de una especie. Igualmente, debido a la homología entre diferentes receptores Notch (por ejemplo, Notch2 y Notch3) en ciertas regiones de las secuencias polipeptídicas de los receptores, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce más de un receptor Notch. Se entiende que, en ciertas modalidades, un anticuerpo o porción de unión que se une de manera específica a un primer objetivo o diana puede unirse o no de manera específica a un segundo objetivo. Como tal, la “unión específica” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva, es decir, unión a un objetivo o diana individual. De esta manera, un anticuerpo, en ciertas modalidades, puede unirse de forma específica a más de un objetivo (por ejemplo, Notch2 y Notch3 humano). En ciertas modalidades, los múltiples objetivos o diana se pueden unir por el mismo sitio de unión al antígeno en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender, en ciertos casos, dos sitios idénticos de unión al antígeno, cada uno de los cuales se une de manera específica a dos o más receptores Notch humanos (por ejemplo, Notch2 y Notch3 humano). En ciertas modalidades alternativas, un anticuerpo puede ser biespecífico y comprender al menos dos sitios de unión al antígeno con diferentes especificidades. A manera de ejemplo no limitante, un anticuerpo biespecífico puede comprender un sitio de unión al antígeno que reconoce un epítipo en un receptor Notch, tal como Notch2 humano, y comprende además un segundo sitio diferentes de unión al antígeno que reconoce un diferente epítipo en un segundo receptor Notch, tal como Notch3 humano. En general, pero de manera no necesaria, la referencia “unión” significa en la presente “unión específica”.

Como se usa en la presente, los términos “unión no específica” y “unión de fondo” cuando se usa en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido se refiere a una interacción que no es dependiente de la presencia de una estructura particular (es decir, el anticuerpo se está uniendo a proteínas en general, en lugar de una estructura particular, tal como un epítipo).

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

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

Los términos “trastorno proliferativo” y “enfermedad proliferativa” se refieren a trastornos asociados con crecimiento celular anormal tal como cáncer.

“Tumor” y “neoplasma” como se usa en la presente se refieren a cualquier masa de tejido que resulte de crecimiento o proliferación celular excesiva, ya sea benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa), incluyendo lesiones precancerosas.

“Metástasis” como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual un cáncer se extiende o transfiere desde el sitio origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva ubicación. Una célula “metastática” o “metastatizante” es una que pierde contactos adhesivos con las células vecinas y migra mediante la corriente sanguínea o linfas desde el sitio primario de enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.

- 5 Como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan de manera indistinta en la presente en referencia a un sujeto humano.
- 10 Los términos “célula madre de cáncer” o “célula madre de tumor” o “célula madre de tumor sólido” se usan de manera indistinta en la presente y se refieren a una población de células de un tumor sólido que: (1) tienen capacidad proliferativa extensa, (2) son capaces de división celular asimétrica para generar una o más clases de progenie diferenciada con potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para auto-renovación o auto-mantenimiento. Estas propiedades de las “células madre de cáncer” o “células madre de tumor” o “células madre de tumor sólido” confieren a estas células madre de cáncer la capacidad de formar tumores palpables que el trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación a la mayoría de células tumorales que fallan en formar tumores. Las células madre de cáncer experimentan auto-renovación versus diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos celulares anormales que pueden cambiar con el paso del tiempo conforme se presenten las mutaciones.
- 15 Los términos “célula de cáncer” o “célula tumoral” y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor incluyendo tanto células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células tumorales y células madre tumorigénicas (células madre de cáncer).
- 20 Como se usa en la presente “tumorigénico” se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido que incluye las propiedades de auto-renovación (que dan lugar a células madre de cáncer, tumorigénicas, adicionales) y proliferación para generar todas las otras células tumorales (que dan lugar a células tumorales diferenciadas y de esta manera no tumorigénicas) que permiten que las células madre de tumor sólido formen un tumor.
- 25 Como se usa en la presente, la “tumorigenicidad” de un tumor se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células del tumor para formar tumores palpables en el trasplante en serie en ratones inmunocomprometidos.
- 30 Como se usa en la presente, los términos “marcador de cáncer de células madre” o “marcador de células madre de cáncer” o “marcador de células madre de tumor” o “marcador de células madre de tumor sólido” se refieren a un gen o genes o una proteína, polipéptido, o péptido expresado por el gen o genes cuyo nivel de expresión, solo o en combinación con otros genes, se correlaciona con la presencia de células tumorigénicas de cáncer en comparación a células no tumorigénicas. La correlación puede referirse ya sea a una expresión incrementada o disminuida del gen (por ejemplo, niveles incrementados o disminuidos ARNm o el péptido codificado por el gen).
- 35 Los términos “signatura de gen de células madre de cáncer” o “signatura de gen de células madre de tumor” o “signatura de células madre de cáncer” se usan de manera indistinta en la presente para referirse a firmas genéticas que comprenden genes diferencialmente expresados en las células madre de cáncer en comparación a otras células o poblaciones de células, por ejemplo tejido epitelial de mama normal. En algunas modalidades, las firmas de gen de células madre de cáncer comprenden genes diferencialmente expresados en células madre de cáncer versus epitelio normal de mama por un cambio en veces, por ejemplo, por una expresión dos veces reducida y/o elevada, y además limitado por el uso de un análisis estadístico, tal como por ejemplo, el valor P de una prueba t a través de múltiples muestras. En otra modalidad, los genes diferencialmente expresados en células madre de cáncer se dividen en firmas de gen de células madre de cáncer basadas en la correlación de su expresión con un gen elegido en combinación con su por ciento o veces de cambio de expresión. Las firmas de células madre de cáncer son predictivas tanto de forma retrospectiva como de manera prospectiva de un aspecto de variabilidad clínica, incluyendo pero no limitado a metástasis y muerte.
- 40 El término “prueba genética” como se usa en la presente, se refiere a procedimientos por los cuales se analiza la constitución genética de un paciente o una muestra de tumor de paciente. El análisis puede incluir detección de ADN, RNA, cromosomas, proteínas o metabolitos para detectar genotipos o cariotipos heredables o somáticos, relacionados a enfermedad, para propósitos clínicos.
- 45 Como se usa en la presente, los términos “biopsia” o “tejido de biopsia” se refieren a una muestra de tejido o fluido que se remueve de un sujeto para el propósito de determinar si la muestra contiene tejido canceroso. En algunas modalidades, el tejido o fluido de biopsia se obtiene debido a que se sospecha que un sujeto tiene cáncer. El tejido o fluido de biopsia entonces se examina para presencia o ausencia de cáncer.
- 50 Como se usa en la presente un “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición farmacéutica tal como un anticuerpo, permite que el anticuerpo, por ejemplo, retenga su actividad biológica. Además, un “portador farmacéuticamente aceptable” no activa una respuesta inmunitaria en un sujeto receptor. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los portadores farmacéuticos normales, tal como solución salina amortiguada con fosfato, agua, y varias emulsiones de aceites/agua. Algunos diluyentes para administración parenteral o en aerosol son solución salina amortiguada con fosfato o solución salina normal (0,9 %).
- 55
- 60
- 65

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, un polipéptido, un polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco efectivo para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cáncer; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento tumoral, aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer, o una combinación de estos efectos en las células de cáncer. En el grado al que el fármaco impide el crecimiento y/o aniquila las células existentes de cáncer, se puede referir como citostático o citotóxico.

Los términos tal como “para tratar” o “tratamiento” o “tratar” o “para aliviar” o “aliviar” se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, desaceleran, disminuyen los síntomas de, y/o detiene el progreso de una condición o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que impiden o desaceleran el desarrollo de una condición o trastorno patológico seleccionado, objetivo. De esta manera, aquellos sin necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en quienes se va a prevenir el trastorno. En algunas modalidades, un sujeto se “trata” de forma exitosa para cáncer de acuerdo a los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de lo siguiente: una reducción en el número de, o ausencia completa de, células de cáncer, una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de, o ausencia de, infiltración de células de cáncer en órganos periféricos, incluyendo la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; inhibición de, o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o una ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducida; y mejora en la calidad de vida. De esta manera, en ciertas modalidades, el tratamiento del cáncer comprende inhibición de crecimiento tumoral en un sujeto.

Como se usa en la presente, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótido o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) enlazadas mediante enlaces de fosfodiéster, incluyendo pero no limitado a, ADN o RNA. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos base conocidos de ADN y RNA, incluyendo, pero no limitado a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil 2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilloguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil 2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético y 2,6-diaminopurina.

El término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende las secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o RNA (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido se puede codificar por una secuencia codificadora de longitud completa o por una porción de la secuencia codificadora en tanto que se retenga la actividad deseada o propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, inmunogenicidad, etc.) del polipéptido de longitud completa o fragmento. El término también abarca la región codificadora de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificadora en tanto los extremos 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo tal que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas 5' de la región codificadora y presentes en el ARNm se refieren como las secuencias no traducidas 5'. Las secuencias localizadas 3' o hacia el extremo 3' de la región codificadora y presentes en el ARNm se refieren como secuencias no traducidas 3'. El término “gen” abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificadora interrumpida con secuencias no codificadoras llamadas “intrones” o “regiones interpuestas” o “secuencias interpuestas”. Los intrones son secuencias de un gen que se transcriben en RNA nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tal como intensificadores. Los intrones se remueven o “cortan” del transcripto nuclear o primario; por lo tanto, los intrones están ausentes en el transcripto de RNA mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u orden de aminoácidos en un polipéptido naciente. Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también puede incluir secuencias localizadas tanto en el extremo 5' como 3' de las secuencias que están presentes en el transcripto de RNA. Estas secuencias se refieren como secuencias o regiones “flanqueadoras” (estas secuencias flanqueadoras están localizadas 5' o 3' a las secuencias no traducidas presentes en el transcripto de ARNm). La región flanqueadora 5' puede contener secuencias reguladoras, tal como promotores e intensificadores que controlan o tienen influencia en la transcripción del gen. La región flanqueadora 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, escisión post-transcripcional, y poliadenilación.

El término “recombinante” cuando se usa con referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo, la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se

derivada de una células modificada de este modo. De esta manera, 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 expresan de otro modo de forma anormal, tal como, por ejemplo, expresan como fragmentos o variantes de empalme, que no se presentan de forma natural. Por el término “ácido nucleico recombinante” se quiere decir en la presente ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma normalmente no encontrada en la naturaleza. De esta manera, se logra el enlace operable de diferentes secuencias. De esta manera, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* al ligar moléculas de ADN que normalmente no se unen, se consideran ambos recombinantes para los propósitos de esta invención. Se entiende que una vez que se produce un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula hospedera u organismo, se replicará de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedera en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, estos ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque se replican de manera subsiguiente de forma no recombinante, aún se consideran recombinantes para los propósitos de la invención. De manera similar, una “proteína recombinante” es una proteína producida usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

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

Como se usa en la presente, el término “expresión génica” se refiere al proceso de convertir información genética codificada en un gen en RNA (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) a través de la “transcripción” del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una RNA-polimerasa), y para genes codificadores de proteína, en proteína a través de la “traducción” del ARNm. Se puede regular la expresión génica en muchas etapas en el proceso. El “favorecimiento de la expresión” o “activación” se refiere a la regulación que incrementa la producción de productos de expresión génica (por ejemplo, RNA o proteínas), en tanto que la “reducción de la expresión”, o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están comprendidos en el favorecimiento de la expresión o reducción de la expresión frecuentemente se llaman “activadores” y “represores”, respectivamente.

Los términos “polipéptido” o “péptido” o “proteína” o “fragmento de proteína” se usan de manera indistinta en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos aplican a polímeros de aminoácido en los cuales uno o más residuos de aminoácido son miméticos químicos artificiales de un correspondiente aminoácido que se presenta de forma natural, así como a polímeros de aminoácidos que se presentan de manera natural y a polímeros de aminoácido que no se presentan de manera natural.

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

“Variantes modificadas de manera conservadora” aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico. Las “variantes de aminoácido” se refieren a secuencias de aminoácidos. Con respecto a secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociados (por ejemplo, naturalmente contiguas). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. De esta manera, en cada posición donde se especifique una alanina por un codón, el codón se puede alterar a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones imperceptibles”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica para un polipéptido también describe variaciones imperceptibles del ácido nucleico. Se reconoce que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, las variaciones imperceptibles para un ácido nucleico que codifican para un polipéptido son implícitas para una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con

respecto a las secuencias reales de sonda. Con respecto a las secuencias de aminoácidos, se reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que altere, añada o suprima un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de manera conservadora” que incluye donde la alteración da por resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Estas variaciones modificadas de manera conservadora son, además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos inter-especie, y alelos de la invención. Las tablas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares útiles para sustituciones conservadoras de aminoácido, son bien conocidos en la técnica. Las sustituciones conservadoras típicas 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) (ver, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). (Ver también tabla 1 de la presente).

Como se usa en la presente descripción y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “uno” y “el”, “la” incluyen formas plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Se va a entender que si las modalidades se describen en la presente con el texto “que comprende”, también se proporcionan modalidades análogas de otro modo descritas en los términos de “que consiste de” y/o “que consiste esencialmente de”.

Ciertas Modalidades de la Presente Invención

La presente invención proporciona composiciones para tratar cáncer. En particular, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona agentes, incluyendo antagonistas, que se unen a receptores Notch y que pueden usarse en métodos para inhibir el crecimiento tumoral y para tratar cáncer u otra enfermedad en pacientes humanos.

Un método para tratar cáncer puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo conjugado a una porción citotóxica que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral.

El método para tratar cáncer puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral en combinación con terapia de radiación.

El método para tratar cáncer puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral en combinación con quimioterapia. El método para tratar cáncer puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral que son de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor pancreático, tumor de próstata, o tumor de cabeza y cuello.

Un método para tratar cáncer puede comprender identificar pacientes para el tratamiento con el anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano usando una prueba genética; y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral. El método para tratar cáncer puede comprender identificar pacientes para el tratamiento con el anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano usando una prueba genética que detecta una signatura de células madre de cáncer; y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une de manera específica a una región de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch humano e inhibe el crecimiento tumoral.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo 59R1 que comprende las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera provistas en SEC ID N°: 16 y 18 (con o sin la secuencia de señal), respectivamente, o como se codifica por el ADN depositado con la ATCC el 15 de Octubre de 2008, y la designación asignada número PTA-9547. La invención proporciona además polipéptidos o anticuerpos que comprenden la región variable de cadena pesada (por ejemplo, SEC ID N°: 14) y/o la región variable de cadena ligera (por ejemplo, SEC ID N°: 13) de este anticuerpo 59R1.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo 59R5 que comprende las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera proporcionadas en SEC ID N°: 49 y 18 (con o sin secuencia de señal), respectivamente, o como se codifica por el ADN depositado con la ATCC el 6 de Julio del 2009 y la designación asignada número PTA-10170. La invención proporciona además polipéptidos o anticuerpos que comprenden las secuencias SEC ID N°: 50 y/o SEC ID N°: 13 de región variable de cadena pesada y/o de región variable de cadena ligera.

Un agente que se une de manera específica a uno o más receptores Notch y es un antagonista de uno o más receptores Notch puede inhibir a al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 %, o aproximadamente 100 % de una o más actividades de los receptores Notch humanos.

5 Un antagonista de uno o más receptores Notch humanos (por ejemplo, Notch2 y/o Notch3) puede tener uno o más de los siguientes efectos: inhibe la unión a ligando a uno o más receptores Notch humanos, inhibe la señalización inducida por ligando por uno o más receptores Notch; inhibe la proliferación de células tumorales; reduce la tumorigenicidad de un tumor al reducir la frecuencia de células madre de cáncer en el tumor; inhibe el crecimiento tumoral; incrementa la supervivencia, activa la muerte celular de células tumorales; inhibe la angiogénesis; o impide la metástasis de células tumorales.

10 El antagonista puede tener uno o más de los siguientes efectos: interfiere con la expresión de un receptor Notch; interfiere con la activación de una ruta de transducción de señales de receptores Notch, por ejemplo, al inhibir de manera estérica las interacciones entre el receptor Notch y uno o más de sus ligandos, o la unión a un receptor Notch humano de activación de la muerte celular y la inhibición de la proliferación celular.

15 Un agente de unión a Notch, o antagonista, puede unirse a un receptor Notch (por ejemplo, Notch2 y/o Notch3) con una constante de disociación de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, o aproximadamente 10 nM o menos. El agente o antagonista puede unirse a uno o más receptores Notch humanos, tal como Notch2 humano y/o Notch3 humano, con una K_D de 1 nM o menos. El agente de unión a Notch puede ser un anticuerpo que se une a Notch2 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos. En algunas modalidades, el agente de unión a Notch es un anticuerpo que se une a Notch3 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos. La constante de disociación para el agente o antagonista con respecto a un receptor Notch particular puede determinarse usando una proteína de fusión de Notch-Fc que comprende el dominio de Notch y/o una porción del dominio extracelular que comprende EGF10 inmovilizado en un chip Biacore.

20 Un antagonista puede unirse de manera específica a Notch3 humano e inhibir la unión de un ligando (por ejemplo, DLL4, JAG1, y/o JAG2) a Notch3 humano y/o inhibir la señalización de Notch3 humano. Un antagonista se puede unir de manera específica a Notch2 humano e inhibir la unión de un ligando (por ejemplo, DLL4, JAG1, y/o JAG2) a Notch2 humanos y/o inhibir la señalización de Notch2 humanos. El antagonista puede inhibir la señalización de Notch2 inducida por DLL4. El antagonista puede inhibir la señalización de Notch3 inducida por DLL4. El antagonista puede inhibir la señalización de Notch2 inducida por JAG2. El antagonista puede inhibir la señalización de Notch3 inducida por JAG2. La señalización por Notch2 y/o Notch3 se puede reducir por al menos aproximadamente 10 %, por al menos aproximadamente 25 %, por al menos aproximadamente 50 %, por al menos aproximadamente 75 %, por al menos aproximadamente 90 %, o por al menos aproximadamente 95 %. La unión de uno o más ligandos a Notch2 y/o Notch3 se puede reducir por al menos aproximadamente 10 %, por al menos aproximadamente 25 %, por al menos aproximadamente 50 %, por al menos aproximadamente 75 %, por al menos aproximadamente 90 %, o por al menos aproximadamente 95 %.

30 Los antagonistas contra un receptor Notch se pueden unir a un receptor Notch y tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibirla proliferación de células tumorales, activar la muerte celular directamente en células tumorales, o prevenir la metástasis de células tumorales. Los antagonistas de un receptor Notch pueden activar la muerte mediante una toxina conjugada, agente quimioterapéutico, radioisótopo, u otro agente por el estilo. Por ejemplo, un antagonista contra un receptor Notch se conjuga una toxina que se activa en células tumorales que expresan el receptor Notch por la internalización de la proteína. Los antagonistas de un receptor Notch pueden mediar la muerte celular de una célula que expresa el receptor Notch mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC comprende la lisis celular por células efectoras que reconocen la porción Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos de tejido, granulocitos y eosinófilos por ejemplo, tienen receptores de Fc y pueden mediar la citólisis (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497).

35 Un antagonista de un receptor Notch puede ser un anticuerpo que activa la muerte celular de células que expresan un receptor Notch al activar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). La CDC comprende la unión del complemento de suero a la porción Fc de un anticuerpo y la activación subsiguiente de la cascada de proteínas de complemento, que da por resultado el daño de la membrana celular y la muerte celular eventual. Se conoce que la actividad biológica de los anticuerpos se determina, en gran grado, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue y Benacerraf, *Textbook of Immunology*, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases difieren a este respecto, como lo hacen los anticuerpos de la misma subclase pero de diferente especie. De los anticuerpos humanos, IgM es la clase más eficiente de anticuerpos para unirse al complemento, seguido por IgG1, IgG3, e IgG2 en tanto que IgG4 parece bastante deficiente en activar la cascada de complemento (Dillman, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1497; Jefferis *et al.*, 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). De acuerdo a la presente invención, se preparan anticuerpos de estas clases que tienen actividad biológica deseada.

60 Se puede valorar la capacidad de cualquier anticuerpo particular contra un receptor Notch para mediar la lisis de la

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

Un agente de unión a Notch o antagonista es un anticuerpo que no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, un anticuerpo puede no tener actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o no tiene actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Un anticuerpo puede no unirse al receptor de Fc y/o factores complemento. Un anticuerpo puede no tener función efectora.

Antagonistas de un receptor Notch pueden activar la muerte celular directamente al inhibir la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos de los vasos preexistentes y es un proceso fundamental requerido para el crecimiento normal, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, curación de heridas, y en la respuesta a la ovulación. El crecimiento de tumores sólidos, mayores de 1-2 mm² también requiere la angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno sin lo cual mueren las células tumorales. De esta manera, un antagonista de un receptor Notch puede tener como objetivo células vasculares que expresan el receptor Notch incluyendo, por ejemplo, células endoteliales, células del músculo liso o componentes de la matriz extracelular requeridos para el montaje vascular. Un antagonista de un receptor Notch (por ejemplo, Notch2 y/o Notch3) puede tener como objetivo pericitos y/o células del músculo liso vascular o inhibir la señalización de factor de crecimiento requerida por el reclutamiento, montaje, mantenimiento o supervivencia de células vasculares. Un antagonista puede modular la función de pericitos y/o células del músculo liso vascular.

Los agentes de unión a Notch o antagonistas (por ejemplo, anticuerpos), ya sea solos o en combinación con un segundo agente terapéutico, pueden ser capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Los agentes de unión a Notch o antagonistas pueden ser capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* (por ejemplo, en un modelo de xenoinjerto de ratón y/o en un humano que tiene cáncer). Los agentes de unión a Notch o antagonistas, pueden ser capaces de inhibir el crecimiento tumoral por al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % en un punto dado del tiempo en un modelo de xenoinjerto. Los agentes de unión a Notch, o antagonistas pueden impedir el crecimiento tumoral. Los agentes de unión a Notch, o antagonistas pueden inhibir la recurrencia tumoral.

Los agentes de unión a Notch pueden ser capaces de reducir la tumorigenicidad de un tumor. El agente o anticuerpo puede ser capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre de cáncer en un modelo animal, tal como modelo de xenoinjerto de ratón. El número o frecuencia de células madre de cáncer en un tumor se puede reducir por al menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces (por ejemplo, en un modelo de xenoinjerto). La reducción en la frecuencia de células madre de cáncer se puede determinar por ensayo de dilución limitante usando un modelo animal. Un ejemplo de un ensayo de dilución limitante usado para probar la eficiencia de un anticuerpo anti-Notch se proporciona en el Ejemplo 8, posterior. Los ejemplos adicionales y la guía con respecto al uso de los ensayos de dilución limitante, para determinar una reducción en el número o frecuencia de células madre de cáncer en un tumor, se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación internacional N^o WO 2008/042236, Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2008/0064049, y 2009/0178305.

También se describen en el presente documento varios polipéptidos, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En ciertos casos, el polipéptido está aislado. En ciertos casos alternativos, el polipéptido está sustancialmente puro.

Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden la secuencia de SEC ID N^o: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56 o 57 (con o sin las secuencias de señal, indicadas), así como los polipéptidos que comprenden los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de SEC ID N^o: 1, 3, 15, 17, 47, 48, 58, 59 o 60 (con o sin las secuencias de señal, indicadas).

Un polipéptido que comprende la cadena pesada y/o la cadena ligera de 59R1 se proporciona en SEC ID N^o: 16 y/o SEC ID N^o: 18, respectivamente.

Un polipéptido que comprende la cadena pesada y/o la cadena ligera de 59R5 se proporciona en SEC ID N^o: 49 y/o SEC ID N^o: 18, respectivamente.

También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N^o: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N^o: 14. También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N^o: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N^o: 50. También se describe un polipéptido que

comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N°: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N°: 52. También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N°: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N°: 53. También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N°: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N°: 54. También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N°: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N°: 55. También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N°: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N°: 56. También se describe un polipéptido que comprende una secuencia de cadena ligera variable que comprende SEC ID N°: 13 y/o una secuencia de cadena pesada variable que comprende SEC ID N°: 57. El polipéptido puede ser un anticuerpo. Se puede unir de manera específica con Notch2 y/o Notch3.

Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la invención se pueden variar sin afectar de forma significativa la estructura o función de la proteína. Si estas diferencias en la secuencia se contemplan, se debe recordar que habrá áreas críticas en la proteína que determina la actividad. De esta manera, las variaciones de los polipéptidos pueden mostrar actividad sustancial. Estos mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo. Guía con respecto a que cambios de aminoácidos se van a silenciar igualmente de forma fenotípica se puede encontrar en Bowie *et al.*, Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions, 1990, *Science* 247:1306-1310.

De esta manera, los fragmentos, derivados, o análogos de los polipéptidos pueden ser: (i) uno en el cual se sustituyan uno o más de los residuos de aminoácido con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (frecuentemente un residuo conservado de aminoácidos) y este residuo de aminoácido sustituido se puede codificar o no por el código genético; o (ii) uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácido incluye a un grupo sustituyentes; o (iii) uno en el cual el polipéptido madura se fusione con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o (iv) uno en el cual los aminoácidos adicionales se fusionen al polipéptido maduro, tal como una secuencia guía o secretoria o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Estos fragmentos, derivados y análogos se juzgan dentro del alcance de las enseñanzas de la presente.

De interés particular son las sustituciones de un aminoácido cargado con otro aminoácido cargado y con un aminoácido neutral o negativamente cargado. Esto último da por resultado proteínas con carga positiva reducida. La carga positiva reducida en una proteína puede conducir a una reducción en la agregación de proteínas y es altamente deseable la prevención de la agregación. La agregación de proteínas no solo puede dar por resultado pérdida de la actividad sino también puede ser problemática cuando se preparan formulaciones farmacéuticas, debido a que los agregados pueden ser inmunogénicos (Pinckard *et al.*, 1967, *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340; Robbins *et al.*, 1987, *Diabetes* 36:838-845; Cleland *et al.*, 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377).

Como se indica, los cambios de aminoácidos son normalmente de naturaleza menor tal como sustituciones conservadoras de aminoácido que no afectan de forma significativa el plegado o la actividad de la proteína (ver Tabla 1).

Tabla 1. Sustituciones Conservadoras de Aminoácido

Aminoácido original	Sustituciones conservadoras de ejemplo
Alanina	Valina, Isoleucina, Leucina, Glicina, Alanina Serina
Arginina	Lisina, Histidina, Glutamina, Asparagina
Asparagina	Glutamina, Histidina, Lisina, Arginina
Ácido aspártico	Ácido glutámico, Asparagina
Cisteína	Serina, Alanina, Metionina
Glutamina	Asparagina
Ácido glutámico	Ácido aspártico, Glutamina
Glicina	Prolina Alanina
Histidina	Asparagina, Glutamina, Lisina, Arginina
Isoleucina	Leucina, Valina, Metionina, Alanina, Fenilalanina, Norleucina
Leucina	Norleucina, Isoleucina, Valina, Metionina, Alanina, Fenilalanina
Lisina	Arginina, Glutamina, Asparagina, Histidina
Metionina	Leucina, Fenilalanina, Isoleucina, Valina, Cisterna
Fenilalanina	Leucina, Valina, Isoleucina, Alanina, Tirosina
Prolina	Alanina, Glicina
Serina	Treonina
Treonina	Serina
Triptofan	Tirosina, Fenilalanina
Tirosina	Triptofan, Fenilalanina, Treonina, Serina

Aminoácido original	Sustituciones conservadoras de ejemplo
Valina	Isoleucina, Metionina, Leucina, Fenilalanina, Alanina, Norleucina

Por su puesto, el número de sustituciones de aminoácido hechas depende de muchos factores, que incluyen aquellos descritos anteriormente. En ciertas modalidades, el número de sustituciones para cualquier polipéptido determinado no será más de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, o 3.

5 En ciertas modalidades, los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan en una forma aislada, y a veces se purifican a homogeneidad.

10 Los polipéptidos incluyen los polipéptidos de SEC ID N^{os}: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57 así como polipéptidos que tienen al menos 90 % de similitud (en ciertos momentos al menos 90 % de identidad de secuencia) a los polipéptidos de SEC ID N^{os}: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57 y al menos 95 % de similitud (en ciertos momentos al menos 95 % de identidad de secuencia) a los polipéptidos de SEC ID N^{os}: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57 y en aún otros casos, el polipéptido que tiene al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de similitud (en ciertos momentos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia) a los polipéptidos de SEC ID N^{os}: 2, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 39, 40, 49, 50, 52, 53 54, 55, 56, o 57. Como se conoce en la técnica, "similitud" entre dos polipéptidos se determina al comparar la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos conservados de aminoácidos de un polipéptido a la secuencia de un segundo polipéptido.

20 Se pueden emplear fragmentos o porciones de los polipéptidos para producir el correspondiente polipéptido de longitud completa por síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos se pueden emplear como compuestos intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa. Los fragmentos o porciones de los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para sintetizar los polinucleótidos de longitud completa de la presente invención.

25 En ciertas modalidades, un fragmento de las proteínas de esta invención es una porción o toda una proteína que es capaz de unirse a una proteína del receptor Notch. Este fragmento tiene una alta afinidad para el receptor Notch o un ligando de un receptor Notch. Ciertos fragmentos de las proteínas de fusión son fragmentos de proteína que comprenden al menos parte del dominio de unión a Notch del agente polipeptídico, o antagonista, fusionado al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina. La afinidad está normalmente en el intervalo de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-12} M, aunque la afinidad puede variar considerablemente con fragmentos de diferentes tamaños, que varía desde 10^{-7} a 10^{-13} M. En algunas modalidades, el fragmento es de aproximadamente 10-110 aminoácidos de longitud y comprende el dominio de unión a Notch del agente polipeptídico, o antagonista, enlazado a al menos parte de una región constante de una inmunoglobulina.

35 Los polipéptidos y análogos se pueden modificar al adicionalmente para contener porciones químicas adicionales normalmente no parte de la proteína. Estas porciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la vida media biológica o la obstrucción de la proteína. Las porciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario indeseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una pista general de estas porciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

40 Los polipéptidos aislados descritos en la presente se pueden producir por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los métodos varían desde métodos de síntesis directa de proteínas, a construir una secuencia de ADN que codifica para secuencias aisladas de polipéptido y que expresan estas secuencias en un hospedero transformado, adecuado.

45 En algunas modalidades de un método recombinante, se construye una secuencia de ADN al aislar o al sintetizar una secuencia de ADN que codifica para una proteína tipo silvestre y de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica del sitio para proporcionar análogos funcionales de los mismos. Ver, por ejemplo, Zoeller *et al.*, 1984, *Proc. Nat Acad. Sci. EUA* 81:5662-5066 y Patente de los Estados Unidos N^o 4.588.585. Otro método para construir una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido de interés será por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos se pueden diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que se favorecen en la célula hospedera en la cual se producirá el polipéptido recombinante de interés.

55 Se pueden aplicar métodos normales para sintetizar una secuencia aislada de polinucleótido que codifica para un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia completa de aminoácidos para construir un gen retro-traducido. Adicionalmente, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado, particular. Por ejemplo, se pueden sintetizar y luego ligar varios oligonucleótidos pequeños que codifican para porciones del polipéptido deseado. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente salientes 5' o 3' para montaje complementario.

60 Una vez montadas (por síntesis, por mutagénesis dirigida al sitio, o por otro método), las secuencias mutantes de ADN que codifican para un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se

enlazarán de manera operativa a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un hospedero deseado. Se puede confirmar el montaje apropiado por secuenciación de nucleótidos, correlación de restricción, y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedero adecuado. Como es bien conocido en la técnica, a fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectedo en un hospedero, el gen se enlaza de manera operativa a secuencias de control de expresión, transcripcionales y transduccionales que son funcionales en el hospedero de expresión elegido.

Se pueden usar vectores recombinantes de expresión para amplificar y expresar polipéptidos codificadores de ADN. Los vectores de expresión, recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican para una fusión de receptor Notch un análogo bioequivalente operativamente enlazado a elementos reguladores transcripcionales o transduccionales adecuados, derivados de genes mamíferos, microbianos, virales o insectiles. Una unidad transcripcional comprende en general un montaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o intensificadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificadora que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de transcripción y traducción, como se describe en detalle más adelante. Estos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Un origen de replicación que usualmente confiere la capacidad para replicarse en un hospedero y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes se pueden incorporar de manera adicional. Las regiones de ADN se enlazan de manera operativa cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN de un péptido de señal (guía secretoria) se enlaza de manera operativa al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor se enlaza de manera operativa a una secuencia codificadora si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se enlaza de manera operativa a una secuencia codificadora si se coloca para permitir la traducción. En general, "operativamente enlazado" significa contiguo y, en el caso de guías secretorias, significa contiguo y en cuadro de lectura. Los elementos estructurales propuestos para el uso en los sistemas de expresión de lavadura incluyen una secuencia guía que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula hospedera. De manera alternativa, donde la proteína recombinante se expresa sin una secuencia guía o de transporte, pueden incluir un residuo N-terminal de metionina. Este residuo se puede escindir opcionalmente de manera subsiguiente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del hospedero. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de hospedero/vector de expresión. Los vectores útiles de expresión para células eucarióticas, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión para SV40, virus de papiloma bobino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores útiles de expresión para hospederos bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tal como plásmidos de *Escherichia coli*, incluyendo pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, y plásmidos de variedad más amplia de hospederos, tal como M13 y fagos de ADN, de hebra individual, filamentosos.

Las células hospederas adecuadas para la expresión de un polipéptido incluyen células procariotas, de levadura, insectiles y eucarióticas superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas de células estabilizadas de origen mamífero como se describen en la presente. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células. Los vectores apropiados de clonación y expresión para el uso con hospederos celulares bacterianos, fungoideos, de levadura y mamíferos se describen por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985).

También se emplean de manera ventajosa varios sistemas de cultivo de células mamíferas o insectiles para expresar la proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células mamíferas se puede realizar debido a que, estas proteínas en general se pliegan de forma correcta, se modifican de manera apropiada y son funcionalmente completas. Los ejemplos de líneas adecuadas de células hospederas mamíferas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman 1981, *Cell* 23: 175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado, incluyendo, por ejemplo, células L, células C127, células 3T3, Células de ovario de hámster chino (CHO), líneas de células HeLa y BHK. Los vectores de expresión, mamíferos, pueden comprender elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor, e intensificador adecuados, enlazados al gen que se va a expresar, y secuencias no transcritas de flanqueo 5' o 3' y las secuencias no traducidas 5' o 3' tal como sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación sitios donadores y aceptadores de empalme, y secuencias de terminación transcripcional. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células insectiles se revidan por Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology* 6:47.

Las proteínas producidas por un hospedero transformado se pueden purificar de acuerdo a cualquier método adecuado. Estos métodos normales incluyen cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad y cromatografía en columna de exclusión de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, por cualquier otra técnica normal para la purificación de proteínas. Se pueden unir, a la proteína, marcas de afinidad tal como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de revestimiento de influenza y glutatona-S-transferasa para permitir una fácil purificación por el paso sobre una columna apropiada de afinidad. También las proteínas aisladas se pueden caracterizar físicamente usando técnicas tal como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos

X.

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

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano usualmente se aísla por extracción inicial de sedimento celulares, seguido por uno o más pasos de concentración, de salación, cromatografía de intercambio iónico acuoso o de exclusión de tamaño. Se puede emplear cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) para pasos finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden desestabilizar por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonido, desestabilización mecánica, o uso de agentes de lisis celular.

En la presente invención, el agente de unión a Notch, o antagonista, comprende un anticuerpo. El anticuerpo está aislado. En ciertas modalidades, el anticuerpo está sustancialmente puro.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEC ID N°: 5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEC ID N°: 6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende GIFFAI (SEC ID N°: 7); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEC ID N°: 8), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEC ID N°: 9), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEC ID N°: 10).

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEC ID N°: 5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEC ID N°: 6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEC ID N°: 51); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEC ID N°: 8), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEC ID N°: 9), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEC ID N°: 10).

La invención también proporciona un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 20; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 19. Por consiguiente, en ciertas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 14; y/o (b) una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 13. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido (por ejemplo, una región variable de cadena ligera) que comprende SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 20; y/o (b) un polipéptido (por ejemplo, una región variable de cadena ligera) que comprende SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 19.

La invención también proporciona un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y Notch3 humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 50; y/o (b) un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 13. Por consiguiente, en ciertas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 50; y/o (b) una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 13. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende: (a) un polipéptido (por ejemplo, una región variable de cadena pesada) que comprende SEC ID N°: 50; y/o (b) a polipéptido (por ejemplo, una región variable de cadena ligera) que comprende SEC ID N°: 13.

En ciertas modalidades, los antagonistas son anticuerpos que pueden mediar la citotoxicidad dependiente de complemento o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo para aniquilar tumores que expresan un antígeno objetivo o diana. En ciertas modalidades alternativas, los anticuerpos se conjugan directamente a toxinas o radioisótopos para mediar la aniquilación de células tumorales. Adicionalmente, la supervivencia del tumor depende de la neo-vascularización, y en ciertas modalidades, los anticuerpos tienen un efecto anti-angiogénico.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados contra Notch2 y Notch3 humano. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal que reconozca de forma específica el receptor Notch descrito. En algunas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que se unen de manera específica a un receptor Notch descrito en la presente. En algunas modalidades, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos quiméricos o humanizados que se unen de manera específica a un dominio extracelular de un receptor Notch descrito en la presente. En otras modalidades, los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que se unen de manera específica al dominio extracelular de un receptor Notch descrito en la presente. En ciertas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos IgG1 o IgG2.

Los anticuerpos contra un receptor Notch encuentran uso en los métodos experimentales, de diagnóstico y terapéuticos, descritos en la presente. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención se usan para detectar la expresión de un receptor Notch en muestras biológicas tal como por ejemplo una biopsia de tejido de paciente, efusión pleural, o muestra sanguínea. Las biopsias de tejido se pueden seccionar y detectar la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. De manera alternativa, las células individuales de una muestra se aíslan, y se detecta la expresión de la proteína en células fijas o vivas por análisis de FACS. Adicionalmente, los anticuerpos se pueden usar en ensayos de proteína para detectar la expresión de un receptor Notch, por ejemplo, en células tumorales, en lisados celulares, o en otras muestras de proteína. En otras modalidades, los anticuerpos de la presente invención se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales al poner en contacto las células tumorales con los anticuerpos ya sea en ensayos basados en células, *in vitro* o en modelos animales *in vivo*. En aún otras modalidades, los anticuerpos se usan para tratar cáncer en un paciente humano al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo contra un receptor Notch.

Se pueden preparar anticuerpos policlonales por cualquier método conocido. Los anticuerpos policlonales se formulan al inmunizar un animal (por ejemplo un conejo, rata, ratón, asno, cabra, etc.) por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples del antígeno pertinente (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.) opcionalmente conjugado a hemocianina de lapa (KLH), albúmina sérica, 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 entonces se recupera de la sangre, ascitis y similares de un animal inmunizado de este modo. La sangre recolectada se coagula, y el suero se decanta, se clarifica por centrifugación, y se valora para el título de anticuerpo. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar de suero ascitis de acuerdo a los métodos normales de la técnica que incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en ge, diálisis, etc.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma, tal como aquellos descritos por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495. Usando el método de hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal hospedero apropiado como se describe anteriormente para provocar la producción por linfocitos de anticuerpos que se unirán de manera específica a un antígeno inmunizador. De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y fusionan con una línea adecuada de células de mieloma, usando por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que entonces se pueden seleccionar de los linfocitos no fusionados y de las células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido como se determina por inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o por un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas (ELISA) entonces se pueden propagar ya sea en cultivo *in vitro* usando métodos normales (Goding, *Monoclonal Anticuerpos: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales entonces se pueden purificar del medio de cultivo o fluido de ascitis como se describe para los anticuerpos monoclonales anteriores.

De manera alternativa, también se pueden producir anticuerpos monoclonales usando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonales se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tal como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótido que amplifican específicamente los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican para las cadenas pesadas y ligeras entonces se clonan en vectores adecuados de expresión, que cuando se transfectan en células hospederas tal como células de *E. coli*, células de COS simiescas, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo la proteína de inmunoglobulina, expresan los anticuerpos monoclonales en las células hospederas. También, se pueden aislar anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos. De la especie deseada de bibliotecas de visualización de fagos, por ejemplo, como se describe en la presente.

- Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonal se pueden modificar adicionalmente de varias maneras diferentes usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas modalidades, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden sustituir 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otras modalidades, las regiones constantes se truncan o remueven para generar el fragmento deseado de anticuerpo de un anticuerpo monoclonal. Adicionalmente, se puede usar mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.
- De manera más general, los anticuerpos modificados útiles en la presente invención se pueden obtener o derivar de cualquier anticuerpo. Adicionalmente el anticuerpo precursor o de origen, o de fragmento del mismo, usado para generar los anticuerpos modificados descritos pueden ser murinos, humanos, quiméricos, humanizados, primates no humanos o primatizador. En otras modalidades, los anticuerpos modificados de la presente invención pueden comprender construcciones de anticuerpo de cadena individual (tal como aquellos descritos en la patente de los Estados Unidos N° 5.892.019) que tienen dominios constantes alterados como se describe en la presente. En consecuencia, cualquiera de estos tipos de anticuerpos modificados de acuerdo con las enseñanzas de la presente son compatibles con esta invención.
- De acuerdo a la presente invención, se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena individual específicos a un polipéptido de la invención (ver, Patente de los Estados Unidos N° 4.946.778). Además, se pueden adaptar métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse *et al.*, 1989, *Science* 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada de Notch, o derivados, o fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos a un polipéptido de la invención se pueden producir por técnicas incluyendo, pero no limitado a: (a) un fragmento $F(ab')_2$ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento de Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento $F(ab')_2$, (c) un fragmento Fab generado para el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, (d) fragmentos Fv.
- Los anticuerpos biespecíficos también están dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes (o, en ciertas modalidades, dos epítopos diferentes en el mismo antígeno). En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un polipéptido antigénico de la invención (Notch, o un fragmento del mismo), en tanto que el segundo objetivo o diana de unión es cualquier otro antígeno, y de manera ventajosa es una proteína de superficie celular, o receptor o subunidad de receptor. Se proporcionan anticuerpos biespecíficos que comprenden un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a un receptor Notch humano (por ejemplo, Notch2) y comprenden además un segundo sitio diferente de unión al antígeno que se une de manera específica a un segundo receptor Notch humano (por ejemplo, Notch3).
- En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos biespecíficos. De manera tradicional, 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, 1983, *Nature* 305:537-539). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpo, de las cuales una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta usualmente se logra por cromatografía de afinidad.
- De manera alternativa, en ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente pueden ser mono-específicos. Por ejemplo, en ciertas modalidades, cada uno de uno o más sitios de unión al antígeno que un anticuerpo contiene es capaz de unirse (o unirse) a los mismos o más receptores Notch humano (por ejemplo, Notch2, Notch3, o epítopos homólogos tanto en Notch2 como Notch3). En ciertas modalidades, un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo mono-específico descrito en la presente es capaz de unirse (o unirse) tanto en la repetición 9 de EGF de Notch3 humano como la repetición 10 de EGF de Notch2.
- Se pueden fusionar dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas de unión a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de charnela, CH2 y CH3. La primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera puede estar presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina, y si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserta en vectores separados de expresión, y se co-transfectan en un organismo hospedero adecuado. Los detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos se pueden encontrar en Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210.
- Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo. En la literatura se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Además, Brennan *et al.*, 1985,

Science 229:81 describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se escinden de manera proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂.

Adicionalmente, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab' de *E. coli* y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Shalaby *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225). Estos métodos se pueden usar en la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizada.

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

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos diferentes epítopos, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido de la invención. De manera alternativa, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores de Fc para IgG para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa un antígeno particular. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir los agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelador de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA.

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos covalentemente unidos. Por ejemplo estos anticuerpos se han propuesto para dirigir las células inmunitarias a las células indeseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellas que comprenden agentes reticuladores. Por ejemplo se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de sulfuro o al formar un enlace de tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-mercaptop butiramirato.

Para los propósitos de la presente invención, se debe apreciar que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptidos de Notch. En este respecto, la región variable puede comprender o se deriva de cualquier tipo de mamífero que se puede inducir para montar una respuesta humoral y para generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado asociado a tumor. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo monos cynomolgus, macacos, etc.) o lupino. En algunas modalidades tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras modalidades, las regiones variables de anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente inhumana) se pueden manejar o adaptar específicamente para mejorar las propiedades de unión o para reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente invención se pueden humanizar o alterar de otro modo a través de la inclusión de secuencias importadas de aminoácidos.

En algunas modalidades, de la presente invención, el anticuerpo monoclonal contra un receptor Notch es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) dentro de las regiones variables. Estos anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y respuesta de HAMA (anticuerpo anti-ratón de humano) cuando se administran a un sujeto humano. En la práctica, normalmente, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos con un mínimo o ninguna secuencia no humana. Un anticuerpo humano es un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano.

Se pueden producir anticuerpos humanizados usando varias técnicas bien conocidas. Un anticuerpo se puede humanizar al sustituir la CDR de un anticuerpo humano con aquellas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster etc.) que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536). El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región menos variable de Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Se pueden preparar anticuerpos humanos usando varias técnicas bien conocidas, incluyendo de animales transgénicos, bibliotecas de fagos, y células B humanas activadas *in vitro*.

Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que contienen locus de inmunoglobulina humana que son capaces, en la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión (J_H) de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da por resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpo. La transferencia del arreglo del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en ratones mutantes de línea germinal dará por resultado la producción de anticuerpos humanos en la estimulación con el antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et*

al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-258; Bruggemann *et al.*, 1993, *Year in Immuno.* 7:33; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669; 5.545.807; 5.545.807; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; y WO 97/17852.

5 De manera alternativa, se puede usar tecnología de visualización de fagos para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. De acuerdo a esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan en cuadro ya sea en un gen de proteína de cubierta principal o menos de un bacteriofago filamentosos, tal como M13 o fd, y se visualizan como fragmentos funcionales de anticuerpo en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN de hebra individual del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan por resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que exhibe estas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. se puede realizar la visualización de fagos en varios formatos. Para la visualización de fagos se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V. Se ha aislado un arreglo diverso de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los vasos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donadores humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos a un arreglo diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos). En la técnica son bien conocidos los métodos para seleccionar anticuerpos humanos de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:309-314; Sheets *et al.*, 1998, *PNAS* 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; McCafferty *et al.*, 1990, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, 1991, *Nature* 352:624-628; y Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597). También se describen técnicas para la generación y uso de bibliotecas de fagos de anticuerpo de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484; y 7.264.963; y Rothe *et al.*, 2008, *J. Mol. Bio.* 376:1182-1200. En la técnica se conocen las estrategias de maduración por afinidad, tal como transposición de cadena (Marks *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783) y se pueden emplear para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

También se pueden preparar directamente anticuerpos humanos usando varias técnicas bien conocidas. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados, inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo. (Ver, por ejemplo, Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Anticuerpos and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77; Boemer *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; Patente de los Estados Unidos Nos. 5.750.373; 5.567.610; y 5.229.275).

Se apreciará que el injerto de los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas producirá anticuerpos quiméricos "clásicos". En el contexto de la presente solicitud, el término "anticuerpos quiméricos" se mantendrá para querer decir cualquier anticuerpo en donde la región o sitio inmunoreactivo se obtiene o se deriva de una primera especie la región constante (que puede estar intacta, ser parcial o estar modificada de acuerdo con esta invención) se obtiene de una segunda especie. En algunas modalidades, la región o sitio de unión al antígeno será de una fuente no humana (por ejemplo, de ratón) y la región constante es humana. En tanto que la especificidad inmunogénica de la región variable no se afecta en general por su fuente, una región constante humana probablemente va a producir menos una respuestas inmunitaria de un sujeto humano que lo que sería la región constante de una fuente no humana.

Los dominios variables tanto en las cadenas pesadas como ligeras se alteran por reemplazo al menos parcial de una o más CDR, y si es necesario, por el reemplazo parcial de regiones menos variables y la modificación de secuencia. Aunque la CDR se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o aún sub-clase como el anticuerpo del cual se deriva en las regiones menores variables, se contempla que las CDR se derivarán de un anticuerpo de clase diferente y de manera preferente un anticuerpo de una especie diferente. Se debe enfatizar que puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. En cambio, solo puede ser necesario transferir estos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dada las explicaciones expuestas en las patentes de los estados unidos Nos. 5.585.089; 5.693.761; y 5.693.762, estará bien dentro de la técnica, ya sea al llevar a cabo la experimentación de rutina o por prueba de ensayo y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

No obstante las alteraciones a la región variable, se apreciará que los anticuerpos modificados de esta invención comprenderán anticuerpos, o fragmentos de inmunoreactivos de los mismos, en los cuales se ha suprimido al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante, o se ha alterado de otro modo para proporcionar características bioquímicas y/o biológicas deseadas tal como localización tumoral incrementada o vida media en suero reducida en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. En algunas modalidades, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatibles con esta invención comprenden adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en la presente pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante (CL) de cadena ligera. En algunas modalidades de la invención, se contemplan regiones constantes

modificadas en donde se suprimen parcial o completamente uno o más dominios. En otras modalidades, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes suprimidos de dominio en donde el dominio CH2 completo se ha removido (construcciones Δ CH2). En aún otras modalidades, el dominio de región constante omitido se reemplazará por un separador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular normalmente impartida por la región constante ausente.

Además de su configuración, se conoce en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 de complemento a anticuerpos se activa el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y en la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar comprendida en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a células mediante la región Fc, con un sitio de receptor de Fc en la región Fc de anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Hay varios receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a receptores de Fc en las superficies celulares activa varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen absorción y destrucción de partículas revestidas de anticuerpo, depuración de complejos inmunitarios, lisis de células objetivo revestidas con anticuerpo por células aniquiladoras (llamada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina. Aunque a cierto grado se han estudiado varios receptores de Fc y sitios de receptor, aún hay mucho que se desconoce a cerca de su ubicación, estructura y funcionamiento.

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

Se señalará que los anticuerpos modificados se pueden manejar para fusionar el dominio CH3 directamente a la región de charnela de los respectivos anticuerpos modificados. En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un separador peptídico entre la región de charnela y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, se pueden expresar construcciones compatibles en donde se haya suprimido el dominio CH2 y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se una a la región de charnela con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Este separador se puede adicionar, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región la charnela permanezca flexible. Sin embargo, se debe señalar que los separadores de aminoácido pueden probar en algunos casos, ser inmunogénicos y producir una respuesta inmunitaria indeseada contra la construcción. Por consiguiente, cualquier separador adicionado a la construcción debe ser relativamente no inmunogénico, o aún, se debe omitir conjuntamente si se van a mantener las calidades bioquímicas y/o biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la supresión de los dominios completos de región constante, se apreciará que los anticuerpos de la presente invención se pueden proporcionar por la supresión o sustitución parcial de unos pocos o un aminoácido individual. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido individual en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc e incrementar de este modo la localización del tumor. De manera similar, puede ser deseable suprimir simplemente esa parte de uno o más dominios región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión de Clq de complemento) que se modula. Estas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero), en tanto que dejan intactas otras funciones deseable asociadas con el presente dominio de región constante. Además, como se alude anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos se pueden modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos lo que mejora el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio conservado de unión (por ejemplo, unión de Fc), en tanto que mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Aún otras modalidades pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables, tal como la función efectora o proporcionar más unión a citotoxinas o carbohidratos. En algunas modalidades puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de los dominios seleccionados de región constante.

Esta invención también abarca anticuerpos biespecíficos que reconocen de manera específica un receptor Notch. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse de forma específica a al menos dos epítomos diferentes. Los diferentes epítomos pueden estar ya sea dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido de receptor Notch) o en diferentes moléculas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden

reconocer y unirse de manera específica a un receptor Notch, también, por ejemplo, 1) una molécula efectora en un leucocito tal como un receptor de células T (por ejemplo, CD3) o un receptor de Fc (por ejemplo, CD64, CD32 o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe en detalle en la presente. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo. Son comunes las técnicas para producir anticuerpos biespecíficos (Millstein *et al.*, 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan *et al.*, 1985, *Science* 229:81; Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:5368; y patente de los Estados Unidos No. 5.731.168).

En ciertas modalidades de la invención, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para incrementar la penetración tumoral, a manera de ejemplo. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto *et al.*, 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 y Brennan *et al.*, 1985, *Science*, 229:81). Sin embargo, ahora estos fragmentos se producen normalmente de forma directa por células hospederas recombinantes como se describe en la presente. De esta manera, los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar todos en y segregar de *E. coli* u otras células hospederas, permitiendo de este modo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. De manera alternativa, estos fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpo, analizadas en la presente. Los fragmentos de anticuerpo también pueden ser anticuerpos lineales como se describe en patente de los Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Serán evidentes otras técnicas para la producción de los fragmentos de anticuerpo.

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

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

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores de crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fungoideo, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), isótopos radiactivos (por ejemplo, un radioconjugado etc). Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de estos inmunoconjugados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercaladores. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina de difteria, cadena de exotoxina A, cadena de ricino A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se producen usando varios agentes acopladoras de proteína bifuncional tal como N-succinimidilo-3-(2-piridiliditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados de bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato-HCL), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutarealdehído), compuestos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como toliene-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). También se pueden usar conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tal como u qaliqueamicina, maytansinoides, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Los anticuerpos conjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias, células indeseadas (patente de los Estados Unidos N° 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína de síntesis, incluyendo aquellos que comprenden agentes reticuladores. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o al formar un enlace de tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención contiene regiones Fc humanas que se modifican para mejorar la función efectora, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad

dependiente del complemento (CDC). Esto se puede lograr al introducir una o más sustituciones de aminoácido en una región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc para permitir formación intracadena de enlaces de disulfuro en esta región para mejorar la aniquilación celular mediada por 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). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumor mejorada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, 1993, *Cancer Research* 53:2560-2565. De manera alternativa, se puede manejar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales (Stevenson *et al.*, 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230).

10 A pesar de como se obtienen cantidades útiles, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en cualquiera de varias formas conjugadas (es decir, un inmunoconjugado) o formas no conjugadas. Los anticuerpos de esta invención se pueden usar en forma no conjugada o "desnuda" para implementar los mecanismos de defensa natural de sujeto incluyendo la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para eliminar las células malignas. En algunas modalidades, los anticuerpos se pueden conjugar a radioisótopos, incluyendo pero no limitado a, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹In, ²¹²Bi, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re y ¹⁸⁸Re usando cualquier de varios queladores bien conocidos o marcación directa. En otras modalidades, las composiciones descritas puede comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o modificadores de respuesta biológica tal como metotrexato, adriamicina y linfoquinas tal como interferón. Aún otras modalidades de la presente invención comprenden el uso de anticuerpos conjugados a biotoxinas específicas, tal como ricino o toxina de difteria. En aún otras modalidades los anticuerpos modificados se pueden volver complejos con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos) en donde la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como una célula efectora tal como una célula T. La selección de que anticuerpo modificado, conjugado o no conjugado, se usará, dependerá del tipo y etapa de cáncer, el uso de tratamiento adjunto (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y condición del paciente. Se apreciará que uno puede hacer fácilmente esta selección en vista de las enseñanzas de la presente.

La preparación y caracterización de anticuerpos anti-Notch también se enseña, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2008/0131434.

30 Los anticuerpos de la presente invención se pueden valorar para unión inmunospecífica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo, que usan técnicas tal como análisis Biacore, análisis de FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis de transferencia Western, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo de "intercalación", ensayo de inmunoprecipitación, reacción con precipitina, reacción de precipitina por difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación a complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente e inmunoensayo de proteína A. Estos ensayos son de rutina y son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

40 En algunas modalidades de la presente invención, la inmunoespecificidad de un anticuerpo contra un receptor Notch se determina usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno, revestir concavidades de una placa de microtítulo de 96 concavidades con antígeno, añadir el anticuerpo contra el receptor Notch conjugado a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) a la concavidad, incubar durante un período de tiempo y detectar la presencia del antígeno. De manera alternativa, el anticuerpo contra un receptor Notch no se conjuga a un compuesto detectable, sino en cambio un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el anticuerpo contra un receptor Notch se añade a la concavidad. Adicionalmente, en lugar de revestir la concavidad con el antígeno, el anticuerpo contra un receptor Notch se puede revestir a la concavidad y se puede añadir un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno a la concavidad revestida. Los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada, así como otras variaciones de los ELISA son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo Ausubel *et al.*, Eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York a 11,2.1).

La afinidad de unión de un anticuerpo a un receptor Notch y la constante de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno se puede determinar por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en la presencia de cantidades crecientes de antígeno son marcados seguidos por la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo contra un receptor Notch y las constantes de disociación de la unión, se pueden determinar de los datos por análisis de gráfica Scatchard. En algunas modalidades, se usa análisis cinético de Biacore para determinar las constantes de asociación y disociación de la unión de los anticuerpos contra un receptor Notch. El análisis cinético de Biacore comprende analizar la unión y disociación de los anticuerpos con chips con antígenos Notch inmovilizados en su superficie.

Un polinucleótido puede tener una secuencia codificadora que es una variante alélica que se presente de forma natural de la secuencia codificadora de los polipéptidos descritos. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alterna de una secuencia de polinucleótido que tiene una sustitución, supresión o adición de uno o más

nucleótidos que no altera de manera sustancial la función del polipéptido codificado.

La presente invención también incluye polinucleótidos, en donde la secuencia codificadora para el polipéptido maduro se puede fusionar en el mismo cuadro de lectura a un polinucleótido que ayuda en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedera, por ejemplo, una secuencia guía que funciona como una secuencia secretoria para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia guía es un preproteína y puede tener la secuencia guía escindida por la célula hospedera para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para un proproteína que es la proteína madura, o más residuos de aminoácido de 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es un proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia permanece una proteína madura activa.

De esta manera, por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede codificar para una proteína madura, o para una proteína que tiene un prosequencia o para una proteína que tiene tanto un prosequencia como prosequencia (secuencia guía).

Los polinucleótidos de la presente invención también puede tener la secuencia codificadora fusionada en cuadro a una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una marca de hexa-histidina suministrada por un vector pQE-9, para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedero bacteriano. O, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una marca de hemaglutinina (HA) cuando se usa un hospedero mamífero, por ejemplo, células COS-7. La marca de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, 1984, *Cell* 37:767).

Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, regiones no codificadoras, o ambas. En algunas modalidades, las variantes de polinucleótido contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresión imperceptibles, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas modalidades, se producen variantes de nucleótidos por sustituciones imperceptibles debido a la degeneración del código genético. Se pueden producir variantes de polinucleótido por varias razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedero particular, tal como el cambio de codones en el ARNm humano aquellos preferidos por un hospedero bacteriano tal como *E. coli*.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas (anticuerpos) que tienen como objetivo o diana un receptor Notch. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales y en el tratamiento de cáncer en pacientes humanos.

Se preparan formulaciones para el almacenamiento y uso al combinar un agente purificado de unión a Notch, o antagonista (anticuerpo) de la presente invención con un portado, excipiente y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable como un polvo liofilizado estéril, solución acuosa, etc. (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Edition Mack Publishing, 2000). Los portadores, excipientes o estabilizadores adecuados comprenden: amortiguadores no tóxicos, tal como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, sales tal como cloruro de sodio, antioxidantes tal como ácido ascórbico y metionina, conservantes, tal como cloruro de octadecildimetil-bencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil-parabenos, tal como metil- o propil-parabeno, catecol, resorcinol ciclohexanol,, 3-pentanol y m-cresol, polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácido); proteínas tal como albúmina sérica, gelatina e inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona, aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina y lisina, carbohidratos tal como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa y dextrina; agentes queladores tal como EDTA, azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa y sorbitol; contra-iones formadores de sales tal como sodio; complejos metálicos tal como complejos de Zn-proteína, y/o agente tensioactivos no iónicos tal como Tween y polietilenglicol (PEG).

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en cualquiera de varias maneras, para tratamiento ya sea local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a membranas mucosas incluyendo administración vaginal y rectal) usando parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aspersiones, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intratumoral o intramuscular; o administración intracraneal (por ejemplo intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en la forma de dosis unitaria. Estas formulaciones incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, granulas, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por inhalación. En composiciones sólidas tal como tabletas el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico. Los ingredientes convencionales de formación de tabletas incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicalcio o gomas, y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición sólida de preformulación que contienen una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxico del mismo. La composición sólida de preformulación entonces se subdivide en formas de dosis unitarias del tipo descrito anteriormente. Las tabletas, píldoras, etc., de la nueva composición se

pueden revestir o combinar de otro modo para proporcionar una forma de dosis que da la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una composición interior cubierta por un componente exterior. Adicionalmente, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o se retrase en la liberación. Se pueden usar varios materiales para estas capas o revestimientos entéricos, estos materiales que incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tal como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen antagonistas (anticuerpos) de la presente invención, vueltos complejo con liposomas (Epstein, *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 82:3688; Hwang, *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 77:4030; y patente de los Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545). Los liposomas con tiempo mejorado de circulación se describen en las patente de los Estados Unidos N° 5.013.556. Se pueden generar algunos liposomas por evaporación de fase invertida con una composición lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño definido de poro para producir liposomas con el diámetro deseado.

El antagonista (anticuerpo) también se puede atrapar en microcápsulas. Estas microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetil-celulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington's, *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Mack Publishing (2000).

Además, se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contiene el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos formados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tal como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli (alcohol vinílico), polilactidos (patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tal como Lupron Depot (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), isobutirato de acetato de sacarosa, y ácido poli-D(-)-3-hidroxitubírico.

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden tanto el agente de unión a Notch, o antagonista y un segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente anti-cáncer y/o un agente anti-angiogénico. Los antagonistas del receptor Notch descritos en el presente documento pueden proporcionar para su uso en métodos para inhibir el crecimiento o proliferación de células tumorigénicas que expresan un receptor Notch. En algunas modalidades, los métodos comprenden inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un receptor Notch2 y/o Notch3 usando cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en la presente. En algunas modalidades, el método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un receptor Notch comprende poner en contacto la célula con un antagonista contra un receptor Notch *in vitro*. Por ejemplo, una línea de células inmortalizadas o una línea de célula de cáncer que expresan un receptor Notch se cultiva en cultivo al cual se añade a un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y/o Notch3 y se inhibe el crecimiento celular. O las células tumorales y/o células madre de tumor se aíslan de una muestra de paciente, tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra sanguínea o se cultivan en medio al cual se añade un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y/o Notch3 e inhibe el crecimiento celular.

En algunas modalidades, el método para inhibir el crecimiento o proliferación de células tumorigénicas que expresan un receptor Notch comprende poner en contacto la célula con un antagonista de Notch2 y Notch3 *in vivo*. En ciertas modalidades, ponerse en contacto con una célula tumorigénica con un antagonista a un receptor Notch se emprende en un modelo de animal. Por ejemplo, los xenoinjertos que expresan un receptor Notch se cultivan en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID). Los ratones se administran a un antagonista del receptor Notch para inhibir el crecimiento tumoral. De manera alternativa, se aíslan células madre de cáncer que expresan un receptor Notch, de una muestra de paciente, tal como, por ejemplo, un tejido de biopsia, difusión pleural, o muestra sanguínea y se inyectan en ratones inmunocomprometidos. Entonces a los ratones se les administra un antagonista contra el receptor Notch para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas modalidades, el antagonista de un receptor Notch se administra al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para impedir el crecimiento tumoral. En otras modalidades, el antagonista de un receptor Notch se administra como un producto terapéutico después de que las células tumorigénicas se han cultivado a un tamaño especificado. En algunas modalidades, el antagonista es una fusión de proteína de receptor Notch que se une de manera específica a un Notch. El antagonista es un anticuerpo que reconoce de manera específica un epítipo de un receptor Notch. El anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

En ciertas modalidades, la puesta en contacto de una célula tumorigénica con un antagonista o un receptor Notch se emprende en un paciente humano diagnosticado con cáncer. Por ejemplo, el método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Notch2 y Notch3 humano. El antagonista es un anticuerpo que se une a Notch2 y Notch3 como se

describe en cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente o en las modalidades mencionadas anteriormente, así como cualquier otro aspecto o modalidades descritas en la presente. En ciertas modalidades, el tumor comprende una supresión o mutación inactivadora en el gen de fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN).

- 5 También se describen métodos para reducir la tumorigenicidad de un tumor (por ejemplo, un tumor que comprende células madre de cáncer). Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto en necesidad del mismo (por ejemplo, el sujeto tiene un tumor) una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de Notch. El antagonista de Notch es un anticuerpo de cualquiera de los aspectos o modalidades mencionadas anteriormente, así como cualquier otra modalidad o aspectos descritos en otra parte de la presente. La frecuencia de células madre de
10 cáncer en el tumor puede reducirse mediante la administración del anticuerpo. El tumor puede ser un tumor colorrectal, tumor de mama, tumor pancreático o melanoma.

- Además se contempla que los agentes y antagonistas de la presente invención se pueden usar para tratar varias condiciones caracterizadas por la expresión de y/o sensibilidad incrementada de células a un receptor Notch. Se describen métodos para tratar enfermedad proliferativa, tal como cáncer, enfermedades asociadas con angiogénesis (por ejemplo, enfermedades dependientes de angiogénesis), y enfermedades en las cuales juega un papel el favorecimiento de la expresión o la reducción de la expresión de la señalización de Notch.
15

- En ciertas modalidades, la enfermedad que se va a tratar con los agentes de unión a Notch, o antagonistas, es una enfermedad relacionada a Notch. En ciertas modalidades, la enfermedad se caracteriza por el favorecimiento de la expresión o reducción de la expresión de la señalización de Notch (por ejemplo, señalización de Notch2 y/o Notch3). En ciertas modalidades, la enfermedad o tumor es dependiente de Notch2 y/o Notch3
20

- De manera particular, se contempla que los antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) contra un receptor Notch se usarán para tratar trastornos proliferativos que incluyen, pero no se limitan a, 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.), sangre y linfas (leucemias y linfomas). En ciertas modalidades, el trastorno proliferativo para el cual se usa el agente de unión a Notch o antagonista, es cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pancreático, o melanoma. En ciertas modalidades, el cáncer comprende células madre de cáncer.
25
30

- En ciertas modalidades, el tumor tratado son tumores sólidos. Los ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar usando una composición terapéutica de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo que se une a Notch incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas tal como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemanglioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. La invención es aplicable a sarcomas y cánceres epiteliales, tal como cánceres ováricos y cáncer de mama. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor colorrectal, tumor de mama, tumor pancreático, o melanoma. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor ovárico. En ciertas modalidades, el tumor es un meduloblastoma. En ciertas modalidades, el tumor comprende células madre de cáncer.
35
40
45

- En ciertas modalidades, la enfermedad que se va a tratar con el agente de unión a Notch, o antagonista, es una enfermedad asociada con angiogénesis. En ciertas modalidades, la enfermedad es cáncer. En ciertas modalidades diferentes, la enfermedad no es una condición cancerosa. Por ejemplo, la enfermedad puede ser degeneración macular húmeda, degeneración macular o relacionada a la edad, retinopatía diabética, una hemangioma, artritis reumatoide, psoriasis, glaucoma neovascular, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis y trastornos inflamatorios del intestino.
50

- En ciertas modalidades, el tumor expresa el receptor o receptores Notch a los cuales se dirige el agente de unión a Notch, o antagonista. En ciertas modalidades, el tumor expresa Notch2 y/o Notch3. En ciertas modalidades, el tumor sobre-expresa Notch2 y/o Notch3. En ciertas modalidades, el tumor es dependiente de uno o más receptores Notch a los cuales, se une de manera específica el anticuerpo administrado. Por ejemplo, en ciertas modalidades, un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 (o Notch2 y Notch3) se puede usar para inhibir el crecimiento o para seleccionar de otro modo como objetivo el tumor dependiente de Notch2. En ciertas modalidades, se puede usar un anticuerpo que se une de manera específica a Notch3 (o Notch2 y Notch3) para inhibir el crecimiento o seleccionar de otro modo como objetivo el tumor dependiente de Notch3. En ciertas modalidades, el tumor comprende células madre de cáncer.
55
60

- En ciertas modalidades, el tumor es homocigótico o heterocigótico para una supresión o mutación inactivadora en el gen que codifica para el supresor tumoral, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN). En ciertas modalidades, el
65

tumor que comprende la supresión o mutación es un tumor de mama.

Los antagonistas se administran como una composición farmacéutica apropiada a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos. Los métodos adecuados de administración incluyen administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intratumoral, intraarterial, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o de inhalación.

En ciertas modalidades, además de administrar un antagonista Notch, el método o tratamiento comprende además un segundo agente terapéutico (antes de, concurrente con, y/o subsiguiente a la administración del antagonista de Notch). En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente anti-cáncer y/o anti-angiogénico. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista Notch y el segundo agente terapéutico.

Se apreciará que la combinación de un antagonista de Notch (por ejemplo, anticuerpo) y un segundo agente terapéutico se puede administrar en cualquier orden o de forma concurrente. En modalidades seleccionadas, los antagonistas Notch se administrarán a pacientes que han experimentado anteriormente el tratamiento con el segundo agente anti-cáncer. En ciertas modalidades diferentes, el antagonista de Notch y el segundo agente terapéutico se administrarán de manera sustancialmente simultánea o concurrente. Por ejemplo, se le puede dar a un sujeto el antagonista de Notch en tanto que se somete a un trascurso de tratamiento con el segundo agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia). En ciertas modalidades, el antagonista de Notch se administrará en el espacio de 1 año del tratamiento del segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades alternativas, el antagonista de Notch se administrará dentro de 10, 8, 6, 4 o 2 meses de cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. En ciertas modalidades diferentes, el antagonista de Notch se administrará en el espacio de 4, 3, 2 o 1 semana de cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, el antagonista de Notch se administrará en el espacio de 5, 4, 3, 2 o 1 día de cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. Adicionalmente, se apreciará que se pueden administrar dos agentes o tratamientos al sujeto dentro de un intervalo de horas o minutos (es decir, de una manera sustancialmente simultánea).

Las clases útiles de agentes antri-cáncer incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, aglutinantes de ranura menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes alquiladores (por ejemplo, complejo de platino tal como cisplatina, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nucleares y carboplatina), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de desempeño, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de tomoisomerasa, alcaloides de vinca per vinca, o similares. En ciertas modalidades, el segundo agente anti-cáncer es un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, o un inhibidor de angiogénesis.

Los agentes anticáncer que se pueden administrar en combinación con los antagonistas de Notch incluyen agentes quimioterapéuticos. De esta manera, en algunas modalidades, el tratamiento comprende la administración combinada de un antagonista de la presente invención y un agente quimioterapéutico o coctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un antagonista puede presentarse antes de, concurrentemente con, o subsiguiente a la administración de las quimioterapias. Las quimioterapias contempladas por la invención incluyen sustancias químicas o fármacos que se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles, tal como doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina-arabinósido (Ara-C), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citocina, taxol, metotrexato, cisplatina, melfalano, binblastina y carboplatina. La administración combinada puede incluir la co-administración, ya sea en una formulación farmacéutica individual o usando formulaciones separadas, por la administración consecutiva en cualquier orden pero en general dentro de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer simultáneamente sus actividades biológicas. Los programas de dosificación y preparación para estos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo a las instrucciones del fabricante o como se determine de forma empírica. La preparación y programas de dosificación para esta quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención también incluyen, pero no se limitan a, agentes alquiladores tal como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo tal como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tal como clorambucil, clornafazina, clolofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenasterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tal como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicin, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tal como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como

ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tal como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; re-abastecedor de ácido fólico tal como frolínico; aceglatona; aldofosfamida-glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantrena; edatraxato; 5 defofamina; demecolcina; diaziadona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxano; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziadona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides tal como paclitaxel (TAXOL) y doxetaxel 10 (TAXOTERE, Rhone); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tal como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Los agentes 15 quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tal como anti-estrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes de quimioterapia que interfieren con la acción de una enzima de topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina—HCL, citrato de daunorubicina, mitoxantrona-HCL, actinomicina D, etopósido, topotecano-HCL, tenipósido (VM-26), e 25 irinotecano. En ciertas modalidades, el segundo agente anticáncer es irinotecano. En ciertas modalidades, el tumor que se va a tratar es un tumor colorrectal y el segundo agente anticáncer es un inhibidor de topoisomerasa, tal como irinotecano.

30 En ciertas modalidades, el agente quimioterapéutico es un anti-metabolito. Un anti-metabolito es un producto químico con una estructura que es similar a un metabolito requerido para reacciones bioquímicas normales, aún suficientemente diferente para interferir con una o más funciones normales de las células, tal como división celular. Los anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo capecitabina, metotrexato sódico, raltitrexed, pemetrexed, tegafur, citocina-arabinósido, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina, y cladribina, así como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente 35 aceptables de cualquiera de los anteriores. En ciertas modalidades, el segundo agente anti-cáncer es gemcitabina. En ciertas modalidades anticáncer, el tumor que se va a tratar es un tumor pancreático y el segundo agente anticáncer es un anti-metabolito (por ejemplo, gemcitabina).

40 En otras modalidades, el tratamiento comprende la administración combinada de un antagonista de la presente invención y terapia de radiación. El tratamiento con un antagonistas puede presentarse antes de, concurrentemente con, o subsiguiente a la administración de la terapia de radiación. Se puede usar cualquier programa de dosificación para esta terapia de radiación.

45 En otras modalidades, el tratamiento puede comprender la administración combinada de anticuerpos de la presente invención con otros anticuerpos contra antígenos adicionales asociados a tumor que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen al receptor de EGF (EGFR) (por ejemplo, Erbitux^{MR}), el receptor de erbB2 (HER2) (por ejemplo, Herceptin^{MR}), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, Avastin^{MR}). En ciertas modalidades alternativas, el Segundo agente anti-cáncer comprende un anticuerpo que se une de manera específica a DLL4 humano u otro ligando de un receptor Notch o un anticuerpo que se une de manera específica a un receptor 50 Notch humano adicional. Los anticuerpos anti-DLL4 de ejemplo, se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US 2008/0187532. Los anticuerpos anti-DLL4 adicionales se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 2008/091222 y WO 2008/0793326, y Publicaciones de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. US 2008/0014196, US 2008/0175847; US 2008/0181899; y US 2008/0107648. Los anticuerpos anti-Notch de ejemplo, se describen, por ejemplo, en la 55 Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US 2008/0131434. En ciertas modalidades, el segundo agente anti-cáncer es un inhibidor de señalización de Notch. En ciertas modalidades, el segundo agente anti-cáncer es un anticuerpo que es un inhibidor de angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF). En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se une de manera específica a un receptor de VEGF. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es AVASTIN (bevacizumab), HERCEPTIN (trastuzumab), VECTIBIX (panitumumab), o ERBITUX (cetuximab). La administración combinada puede incluir la co-administración, ya sea en una formulación farmacéutica individual o usando formulaciones separadas, o la administración consecutiva en cualquier orden pero en general dentro de un periodo de tiempo tal que todos los 60 agentes activos pueden ejercer simultáneamente sus actividades biológicas.

65 Adicionalmente, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas (por ejemplo, linfocinas, interleucinas, factor de necrosis tumoral, y/o factores de crecimiento) o se puede acompañar por remoción quirúrgica

de células de cáncer o cualquier otra terapia que se juzgue necesaria por un facultativo que trate.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un antagonista de la presente invención depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, de la severidad y el transcurso de la enfermedad, de la sensibilidad de la enfermedad, ya sea que el antagonista se administre para propósitos terapéuticos o preventivos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente, y demás, todo a discreción del facultativo que trata. El antagonista se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días a varios meses, o hasta que se efectúa una curación o se logra una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Se pueden calcular programas óptimos de dosificación de las mediciones de la acumulación de fármaco en el anticuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un antagonista individual. El facultativo que administra puede determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías óptimas de dosificación y proporciones de repetición. En general, la dosis es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, y se puede dar una vez o más de una vez al día, de manera semanal, o mensualmente o anualmente, el facultativo que trata puede estimar las proporciones de repetición para la dosificación basándose en los tiempos medidos de residencia y basándose en las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales.

En ciertas modalidades, los pacientes bajo consideración para tratamiento con el antagonista de Notch se examinan antes del tratamiento con el antagonista de Notch. En ciertas modalidades, un tumor en un paciente o un tumor que se ha removido de un paciente se prueba para la presencia de células madre de cáncer. En ciertas modalidades, el tumor se prueba para la expresión de uno o más receptores Notch (por ejemplo, Notch2 y/o Notch3) a los cuales se une el antagonista. En ciertas modalidades, el tumor se trata para la presencia de una supresión o mutación inactivadora en el gen que codifica para el supresor tumoral, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN). En ciertas modalidades, el tumor que se va a probar es un tumor de mama.

Por ejemplo, la invención proporciona un método para seleccionar un sujeto para el tratamiento con un antagonista de Notch2 y/o Notch3, en donde el sujeto tiene un tumor o se le ha removido un tumor. En ciertas modalidades, el método comprende (a) determinar si el tumor comprende una supresión o mutación en el gen de PTEN, y (b) seleccionar el sujeto para el tratamiento con el antagonista de Notch3 si el tumor comprende la supresión o mutación.

En ciertas modalidades alternativas de la presente invención, los pacientes examinados para la presencia de adenomas de colon o pólipos, se prueban para pérdida alélica y mutaciones somáticas mediante una prueba genética. En algunas modalidades, la prueba genética examina la pérdida o mutaciones en la ruta de Wnt que incluye, por ejemplo, en APC, Axina2 o beta-catenina. Pueden usarse equipos para realizar los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, un equipo comprende un anticuerpo o anticuerpos específicos para un receptor Notch, o anticuerpo o anticuerpos purificados, en uno o más recipientes. En algunas modalidades, un equipo comprende además un receptor Notch sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con el anticuerpo o anticuerpos incluidos en el equipo, un anticuerpo de control que no reacciona con el receptor Notch, y/o un medio para detectar la unión de un anticuerpo a un receptor Noch (tal como por ejemplo, un cromóforo fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radioactivo o un compuesto luminescente conjugado al anticuerpo contra un receptor Notch o a un segundo anticuerpo que reconoce el anticuerpo contra un receptor Notch). En otras modalidades, un equipo comprende reactivos específicos para la detección de ARNm o ADNc (por ejemplo, sondas o cebadores de oligonucleótidos) de uno o más receptores Notch. En algunas modalidades, los equipos contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y presentación de resultados.

Un equipo de compartimientos incluye cualquier equipo en el cual estén contenidos los reactivos en recipientes separados. Estos recipientes incluyen pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o papel. Estos recipientes permiten transferir de manera eficiente reactivos de un compartimiento a otro compartimiento tal que no se contaminen de forma cruzada las muestras y los reactivos, y los agentes o soluciones de cada recipiente se pueden añadir de una manera cuantitativa de un compartimiento a otro. Estos recipientes incluirán un recipiente que aceptará la muestra de prueba, un recipiente que contiene los anticuerpos o sondas usadas en los métodos, recipientes que contienen agentes de lavado (tal como solución salina amortiguada con fosfato, amortiguadores Tris, etc.), y recipientes que contienen los reactivos usados para detectar el anticuerpo o sonda unida. Se reconocerá fácilmente que los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos descritos de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos establecidos de equipo que son bien conocidos en la técnica.

Un equipo puede comprender un agente de unión a Notch, o antagonista, y un segundo agente terapéutico. El agente de unión a Notch, o antagonista, es un anticuerpo que se une de manera específica a Notch2 y/o Noth3. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente anti-cáncer y/o un agente anti-angiogénico.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de Anticuerpos Humanos a Notch2

Se aislaron, mediante tecnología de visualización de fagos, anticuerpos humanos que reconocen de manera específica la porción de no unión a ligando del dominio extracelular de un receptor Notch2. Se examinó una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos para el reconocimiento específico y de alta afinidad de un receptor Notch2.

De forma breve, se incubaron 2×10^{13} partículas de fagos de visualización de Fab con una proteína de fusión de Notch2-Fc recombinante, pasivamente inmovilizada (SEC ID N°: 21) que comprende el sitio extracelular de unión a ligando de Notch2 y que se circunda las repeticiones EGF (EGF1-12) en la ronda uno. Los fagos no específicos se lavaron, y luego los fagos específicos se eluyeron con DTT. La salida eluda se usó para infectar bacterias F+ TG1, se rescataron con fagos auxiliares, y luego la visualización de Fab se indujo con IPTG (0,25 mM). Este proceso se repitió durante dos rondas adicionales y luego la ronda tres se examinó en ELISA contra fusión de Notch2 (EGF1-12)-Fc recombinante pasivamente inmovilizada (5 µg/ml).

Se identificó un Fab particular (59R1) que se une al receptor Notch2 humano y se bloquea la unión de Dentado1 a Notch2 humano. Se verificó la unión del Fab 59R1 a Notch2 humano por ensayo de FACS usando una línea de células humanas estables HEK-293 que sobre-expresaron Notch2 humano (hN2) (Figura 1A). Se detectó la unión a Fab por Fab anti-humano de cabra conjugado a ficoeritrina (PE) (Jackson Immunochemicals). El Fab 59R1 (referido en la Figura 1a como clon 1) demostró buena unión a hN2. El Fab 59R1 también demostró buena actividad bloqueadora contra el ligando de Notch, Dentado1 humano, en un ensayo de unión usando la misma línea de células estables (Figura 1B). Se determinó el bloqueo y unión a ligando al incubar el dominio extracelular de hDentado1 (ECD) fusionado a la región constante Fc humana con las células y los Fab seleccionados de la biblioteca de fagos y usando anticuerpos específicos Fc gama anti-humano de cabra conjugados con PE (Jackson Immunochemicals) para detección.

Las secuencias de la VH y VL del Fab 59R1 se proporcionan en SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 12 (incluyendo secuencias de señal bacteriana de N-término que se escinden en la secreción), respectivamente. La CDR del Fab 59R1 son como se indica en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. CDR de anticuerpos Fab e IgG humanos 59R1

Guía	cadena pesada			cadena ligera		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
59R1	SSSGMS (SEC ID N°: 5)	VIASSGSNTYYADSVKQ (SEC ID N°: 6)	GIFFAI (SEC ID N°: 7)	RASQSVRSNYLA (SEC ID N°: 8)	GASSRAT (SEC ID N°: 9)	QQYSNFPI (SEC ID N°: 10)

Se clonaron regiones variables basándose en aquellas del Fab 59R1 en vectores de expresión de Ig que contienen la cadena ligera kappa y cadena pesada de IgG2 humana junto con sus respectivas secuencias de señal de mamífero para la expresión en células de ovarios de hámster chino (CHO). La VH y VL del anticuerpo IgG 59R1 se proporcionan como SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo IgG 59R1 (incluyendo secuencias de señal) se proporcionan como SEC ID N°: 16 y SEC ID N°: 18, respectivamente. La secuencia de señal en el N-término de la secuencia de aminoácidos de cada una de las cadenas se escinde en la secreción. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo IgG 59R1 se proporcionan como SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3, respectivamente. Se usó purificación por proteína A para purificar los anticuerpos. El ADN de plásmido bacteriano que contiene una inserción de ADN sintético que codifica para la cadena pesada y ligera del ADN del anticuerpo IgG2 59R1 se depositó como "59R1" con la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA EUA, según las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008, y designación asignada número PTA-9547.

Además, el anticuerpo IgG2 59R1 se valoró para su capacidad para bloquear la unión de DLL4 al receptor Notch2 humano por análisis de FACS. Las células HEK-293 que sobre-expresan de manera estable Notch2 humano se incubaron con el anticuerpo a varias concentraciones y luego se detectó la unión a hNotch2 (Figura 1C) por anticuerpo específico Fc gamma anti-humano de cabra conjugado con PE, o actividad de bloqueo de ligando (Figura 1D). Se determinó el bloqueo a ligando al incubar las células con DLL4 ECD humano marcado con región constante Fc de conejo y el anticuerpo 59R1 a varias concentraciones, y luego se detectó el hDLL4 por anticuerpo anti-conejo de asno conjugado con PE. De esta manera se confirmó la unión de hNotch2 y la actividad bloqueadora de ligando para el anticuerpo IgG2 59R1.

También se expresó una variante de línea germinal de 59R1 (referida en la presente como "59RGV") y se purificó. La VH y VL del anticuerpo 59RGV se proporcionan como SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo 59RGV (incluyendo secuencias de señal) se proporcionan como SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4, respectivamente. La secuencia de señal en el N-término de la secuencia de aminoácidos de cada una de las cadenas se escinde en la secreción. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 59RGV se proporcionan como SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 17, respectivamente.

Las CDR altamente hidrófobas tienen el potencial, en ciertos casos, de permitir la unión no específica desfavorable por un anticuerpo. Puesto que la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de 59R1 tiene un grado inusual de carácter hidrófobo, se produjeron variantes de 59R1 que contuvieron secuencias CDR3 de cadena pesada con carácter hidrófobo disminuido. Se llevó a cabo la maduración por afinidad de CDR3 de cadena pesada al permitir cambios restringidos de la secuencia parenteral (GIFFAI; SEC ID N°: 7) como se muestra en la Figura 1E. Los aminoácidos permitidos en cada posición se permitieron cambiar de los residuos de origen a los residuos indicados en la Figura 1E. Se aislaron variantes mejoradas al examinarlas para la capacidad mejorada de bloqueo de JAG1 como se muestra en la Figura 1F (indicado con flechas). De forma breve, se mezclaron Fab (1 y 10 µg/ml) con hJAG1-rc Fc (pre-agrupado 5 µg/ml a 2 µg/ml de anti-conejo de asno conjugado a PE) y luego se añadieron a células 293 establemente transfectadas con hNotch2. Entonces se valoró la unión a hJAG1 usando citometría de flujo. Se aislaron seis variantes mejoradas (versus Fab 59R1) y sus secuencias de HC CDR3 fueron como sigue: SIFYPT (SEC ID N°: 22), SSFFAS (SEC ID N°: 23), SSFYAS (SEC ID N°: 24), SSFFAT (SEC ID N°: 25), SIFYPS (SEC ID N°: 26), y SSFFAN (SEC ID N°: 27). Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada para estas variantes son secuencias SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, y SEC ID N°: 57.

Ejemplo 2

Reactividad Cruzada y Afinidad de Unión del Anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3

Se determinó la capacidad del anticuerpo IgG2 59R1 para reaccionar de forma cruzada con otros receptores Notch por ensayo de FACS usando células HEK-293 transfectadas de manera transiente con el plásmido de expresión de Notch1, Notch2, Notch3 o Notch4 humano y proteína fluorescente verde (GFP) como un control de transfección. Las células positivas a GFP indicaron la expresión del transgen. La IgG2 59R1 se añadió a las células a 2 µg/ml y se detectó por Fc gamma específica anti-humano de cabra conjugada con PE (Jackson Immunochemicals). Todas las construcciones Notch fueron de longitud completa. Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, el anticuerpo IgG2 59R1 se une de manera específica tanto a Notch3 humano como a Notch2 humano, pero no se une de manera significativa a Notch1 humano o Notch4 humano de longitud completa.

Mediante un instrumento Biacore 2000 se determinaron las afinidades para Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4 de humano y ratón. De forma breve, las proteínas de Notch recombinantes de humano y ratón (EGF10-15 para Notch1, 2 y 4; EGF9-14 para Notch3) se inmovilizaron en un chip CM5 usando química basada en amina normal (NHS/EDC). Para hNotch2, también se detectó EGF1-12 para la unión. Se inyectaron diferentes concentraciones de anticuerpo (1-100 nM) sobre las superficies de proteína y se recolectaron los datos cinéticos con el paso del tiempo. Los datos se ajustaron usando la ecuación de ajuste global simultáneo para producir las constantes de disociación (K_D , nM) para cada Notch (Tabla 3).

Tabla 3

constantes de disociación (K_D) de IgG 59R1								
Ab	mNotch1 (nM)	hNotch1 (nM)	mNotch2 (nM)	hNotch2 (nM)*	hNotch2 (nM)**	mNotch3 (nM)	hNotch3 (nM)	hNotch4 (nM)
59R1	>10	86,4	0,35	<0,1	<0,1	0,13	0,12	NB
	*N2(EGF1-12)							
	*N2(EGF 10-155)							

Ejemplo 3

Correlación de Epítomos de Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3

Para identificar anticuerpos que reconocen regiones específicas de no unión a ligando de los dominios extracelulares del receptor Notch, se realizó la correlación de epítomos.

La unión de los anticuerpos anti-Notch2/3 al sobrenadante de células HEK 293 transfectadas con secuencias que codifican para proteínas de fusión de Notch2-Fc humanas recombinantes que comprenden la proteína de Notch2 de humano de longitud completa o varias construcciones de supresión de Notch2 humano que contiene varias supresiones de las repeticiones uno a doce de EGF se probaron por ELISA. Ver Tabla 4 posterior. Se transfectaron de manera transiente células HEK-293 con pADNc 3,1 (Invitrogen) con los ADNc de hNotch2 que codifican para los aminoácidos indicados fusionados a la región constante de IgG humana (hFc). Los sobrenadantes se recolectaron 48 horas más tarde. Para capturar las proteínas de hN2-hfc, primero se revistieron placas de 96 concavidades con IgG específica de Fc gama anti humano de cabra (Jackson Immunochemicals, #109-0026-098) a 100 ng por concavidad en amortiguador de bicarbonato de sodio durante la noche a 4°. Las placas se lavaron y bloquearon en suero bovino al 5 %/PBS-Tween 20. Se añadieron sobrenadantes a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron en PBS-T. Se añadió Fab 59R1 a 10 µg/ml en suero al 5 %/PBS-T y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS-T. Se detectó la unión de Fab por anticuerpo específico de Fab anti-humano de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (Thermo, # 31414) diluida 1:5000 en suero al 5 %/PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y revelaron con 1 Step

Ultra TMB (Thermo, # 34028). Las placas se leyeron en un lector de placa Perkin Elmer Victor 1420. El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 se unió sólo al sobrenadante de células que expresan proteínas Notch2 recombinantes que comprende EGF10, que consiste de los aminoácidos 375-417 de Notch2 humano. (Figura 3A).

5 Tabla 4. Construcciones de supresión de Notch2 humano

	Construcción	aminoácidos
	hN2 1-3	1-144
	hN2 1-4	1-181
	hN2 1-5	1-221
10	hN2 1-6	1-263
	hN2 1-7	1-301
	hN2 1-8	1-341
	hN2 1-9	1-378
	hN2 1-10	1-417
15	hN2 1-11	1-456
	hN2 1-12	1-493
	hN2 8-12	296-493
	hN2 9-12	326-493
	hN2 10-12	375-493
20	hN2 11-12	413-493
	hN2 12-12	454-493

Adicionalmente, el análisis de FACS muestra que la unión del anticuerpos Fab 59R1 se retuvo cuando se suprimieron EGF11 o EGF12 de la proteína recombinante de longitud completa de Notch2 expresada por células HEK 293 (Figura 3B). Se hicieron mutaciones puntuales dentro de EGF10 de las proteínas de fusión de Notch2 y se determinó la unión de 59R1 a cada mutante de EGF10 por análisis de FACS. Se transfectaron de manera transciente células HEK-293 con el plásmido indicado de expresión de Notch y GFP como un control de transfección. Las células positivas a GFP indicaron la expresión de transgen. El anticuerpo Fab 59R1 se añadió a las células a 10 µg/ml y se detectó por anti-humano de cabra conjugado con PE (Jackson Immunochemicals).

Para verificar que la pérdida de repetición 10 de EGF no interfiera con la unión a ligando, se generó un hNotch2 mutante que carece de los aminoácidos 375-412 y se probó para la unión a 59R1, 59M70 monoclonal de hNotch2 dirigido contra EGF 1-4, y la unión al ligando humano de DLL4 (Figura 3C). El análisis de FACS de células HEK-293 transfectadas de manera transciente con el plásmido indicado de expresión de Notch y GFP como un control de transfección. Las células positivas a GFP indican la expresión del transgen. Se añadió Anti-Notch2 (59M70) a 20 µg/ml y se detectó por anti-ratón de cabra conjugado con PE (Catálogo, #3004-4). Se añadió 59R1 (IgG2) a las células a 2 µg/ml y se detectó por Fc gamma específica anti-humano de cabra conjugada con PE (Jackson Immunochemicals). Se determinó la unión a ligando por incubación de las células con el dominio extracelular (ECD) de DLL4 humano fusionado a la región constante IgG de conejo a 5 µg/ml y se detectó por anti-conejo de asno conjugado con PE. Como se muestra en la Figura 3C, el ligando y 59M70 se unen ambos a hNotch2 en la ausencia de EGF 10, pero no lo hace 59R1.

Un análisis de comparación de las regiones de EGF10 de Notch1, Notch2 y Notch4 humanos y la región de EGF9 de Notch3 humano (el equivalente de EGF10 en los otros receptores Notch) se realizó para determinar los probables sitios de unión para 59R1 (Figura 14A). Como resultado del análisis, se crearon varios mutantes puntuales dentro de Notch2 de longitud completa, convirtiendo los residuos dentro de EGF10 a los correspondientes aminoácidos en Notch1 humano. También, por el contrario, se hicieron mutaciones puntuales en los residuos convertidores de EGF 10 de hNotch1 a los correspondientes residuos de hN2. Se generaron mutantes en las secuencias de Notch de longitud completa por mutagénesis QuikChange^{MR} (Stratagene) y se verificaron por secuenciación. Se determinó la unión a los mutantes por análisis de FACS (Figuras 14B y 14C). Se detectó 59R1 por anticuerpo específico de Fc gamma anti-humano de cabra conjugado con PE (Jackson Immunochemicals, #109-116-170). Los aminoácidos necesarios para la unión de 59R1 a hNotch2 se determinaron de esta manera, que son histidina 385, alanina 388 y leucina 389 (residuos dentro de la secuencia hNotch2 en cuadro mostrada en la Figura 14A). Los correspondientes residuos en hNotch3 son histidina 361, alanina 364 e isoleucina 365.

55 Ejemplo 4

Anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3 Inhibe la Señalización de Notch2

60 Se usaron ensayos de indicadores de luciferasa para valorar el anticuerpo 59R1 para su capacidad para bloquear señalización de Notch2 inducida por hDLL4, hJAG1 y hJAG2.

Células Hela que sobreexpresan de manera estable Notch2 humano se transfectaron de manera transciente con luciferasa de luciérnaga, con un promotor 8X CBS sintético (Ong *et al.*, 2006, *J. of Biological Chemistry*, 281:5106-5119), pSPORT6 MAML-1, y luciferasa de Renilla-CMV como un control de transfección. Las células se incubaron con 100 ng de hDLL4 inmovilizado (R&D systems) con los anticuerpos indicados durante 16 horas y luego se

valoraron usando Dual-Glo (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de control estuvo a una concentración de 40 µg/ml. El anticuerpo IgG2 59R1 se tituló, iniciando 40 µg/ml, y luego se diluyó por un cuatro. El inhibidor de gamma-secretasa (GSI) dibenzazepina (DBZ) se usó como un control a 1 µM. Como se muestra en la Figura 4A, el anticuerpo 59R1 se encontró que inhibe la actividad de indicador de Notch2 inducida por hDLL4.

Las células Hela que sobreexpresan de manera estable Notch2 humano se transfectaron de manera transiente con luciferasa de luciérnaga, con un promotor 8X CBS sintético, pSPORT6 MAML-1, y luciferasa de Renilla-CMV como un control de transfección. Las células se incubaron con ya sea 200 ng de hJAG1 inmovilizado (R&D systems) o hJAG2 (R&D systems) durante 16 horas y luego se valoraron usando Dul-Glo (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El anticuerpo IgG2 59R1 estuvo a una concentración de 40 µg/ml. El inhibidor de gamma-secretasa (GSI) dibenzazepina (DBZ) se uso como un control en 1 µM. Como se muestra en las Figuras 4B y 4C, se encontró que el anticuerpo 59R1 inhibe la actividad de indicador de Notch2 tanto inducida como hJAG1 como hJAG2, respectivamente.

Ejemplo 5

Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 Impide el Crecimiento Tumoral *in vivo*

Este ejemplo describe el uso de un anticuerpo (59R1) anti-receptor Notch2/3 que se une a la región de unión a ligando de los receptores Notch (EGF10 de Notch2 y EGF10 de Notch3) para impedir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto.

En ciertas modalidades, ratones NOD/SCID inyectados con 50,000 células de tumor de mama PE13 o T3 se trataron con el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 o el anticuerpo de control 1B7,11 dos días después de las inyecciones celulares. Los anticuerpos se dosificaron a 10 mg/kg dos veces por semana. El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 redujo de manera significativa el crecimiento tanto de tumores PE13 (Figura 5) como de T3 (Figura 5B) en comparación al control.

Ejemplo 6

Tratamiento *in vivo* de Tumores Usando Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3

Este ejemplo describe el uso de anticuerpo anti-Notch2/3 para tratar cáncer en un modelo de xenoinjerto.

En un experimento, se inyectaron un 1×10^7 células viables de tumor de colon Colo-205 a ratones hembra *bg/un XID* inmunodeficientes de 6-8 semanas de edad en un antecedente Swiss CD-1. Los tumores se dejaron crecer a un tamaño de entre 65 a 200 mm³ después de lo cual se aleatorizaron los ratones (n = 10 por grupo experimental), y se empezó la administración de los anticuerpos. Los animales se trataron con 15 mg/kg de ya sea anticuerpos 1B7,11 de control o los anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3 una vez por semana. Dos veces se midió el tamaño del tumor, y el volumen del tumor se calculó como se describe (ver Michieli *et al.*, 2004, *Cancer Cell*, 6:61-73). El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 redujo de manera significativa el crecimiento del tumor Colo-205 en comparación al control (Figura 5C).

En otro experimento, se probaron anticuerpos anti-Notch2/3 para un efecto en el crecimiento de tumor pancreático. Ratones NOD/SCID se inyectaron con 30,000 células de tumor pancreático PN4 de forma subcutánea en el flanco derecho, y los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100 mm³. Los animales se aleatorizaron y se inició la dosificación del anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 o el anticuerpo 1B711 de control. Los anticuerpos se dosificaron a 15 mg/kg dado una vez por semana. El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 redujo de forma significativa el crecimiento del tumor PN4 en comparación al control (Figura 5D).

En un experimento adicional, se probaron unos anticuerpos anti-Notch2/3 para un efecto en el crecimiento de tumor de mama. Ratones NOD/SCID se inyectaron con 50,000 células de tumor de mama PE13 o T3 y los tumores se dejaron crecer a un tamaño de entre 65 a 200 mm³ después de lo cual se aleatorizaron los ratones (n = 10 por grupo experimental), y se empezó la administración de los anticuerpos. Los animales se trataron con 15 mg/kg de ya sea los anticuerpo 1B7,11 de control o anticuerpos 59R1 anti- Notch2/3 dos veces por semana. Se midió el tamaño del tumor dos veces por semana, y se calculó el volumen tumoral como se describe (ver Michieli *et al.*, 2004). El anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 redujo de forma significativa el crecimiento tanto de tumores PE13 (Figura 5E) como de TE (Figura 5F) en comparación al control.

En el punto final del tratamiento del anticuerpo, los tumores se recolectaron para el análisis adicional. En algunas modalidades, se analiza una porción del tumor por inmunofluorescencia para valorar la penetración del anticuerpo en el tumor y la respuesta del tumor. Una porción de cada tumor recolectado de ratones tratados con el anticuerpo anti-Notch2/3 y tratados con el anticuerpo de control, se congeló recientemente en nitrógeno líquido, se incrustó en O.C.T., y se cortó en un criostato como secciones de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio. De manera alternativa, una porción de cada tumor se fija en formalina, se incrusta en parafina, y se corta en un microtomo como secciones de

10 μ m sobre sobre-portaobjetos de vidrio. Las secciones se post-final y se incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen de manera específica los anticuerpos inyectados para detectar el anticuerpo anti-Notch2/3 o anticuerpos de control presentes en la biopsia tumoral. Adicionalmente, los anticuerpos que detectan diferentes tipos de células tumorales y células reclutadas por tumor, tal como, por ejemplo, anticuerpos anti-VE cadherina

5 (CD144) o anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células endoteliales vasculares, anticuerpos alfa-actina de músculo liso detectan células del músculo liso vascular, anticuerpos anti-Ki67 para detectar células proliferantes, ensayos TUNEL para detectar células moribundas, y anticuerpos anti-fragmento de Notch de dominio intracelular (ICD), para detectar señalización de Notch, se pueden usar para valorar los efectos del tratamiento del anticuerpo en la angiogénesis, crecimiento tumoral y morfología tumoral.

10 También se puede valorar el efecto del tratamiento con anticuerpo anti-Notch2/3 en la expresión génica de células tumorales. Se extrae el RNA total de una porción de cada tumor recolectado de ratones tratados con el anticuerpo Notch2/3 y tratados con el anticuerpo de control y se usaron para RT-PCR cuantitativa. Se analizan los niveles de expresión de Notch2/3, de los componentes de la ruta de señalización de Notch2 y/o Notch3, así como de los marcadores de células madre de cáncer, que incluyen, por ejemplo, CD44, con relación al gen GAPDH de mantenimiento como un control interno. De esta manera se determinan los cambios en la expresión del gen de células tumorales en el tratamiento con el anticuerpo de Notch2/3.

15 Además, se puede valorar el efecto del tratamiento con anticuerpo con anti-Notch2/3 en la presencia de células madre de cáncer en un tumor. Muestras de tumor de ratones tratados con anticuerpo de Notch2/3 versus anticuerpo de control se cortan en piezas pequeñas, se trituran completamente usando cuchillas estériles, y se obtienen suspensiones celulares individuales por digestión enzimática y trituración mecánica. Las células tumorales disociadas entonces se analizan por análisis de FACS para la presencia de células madre tumorigénicas de cáncer basándose en la expresión del marcador de superficie celular ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- como se describe en detalle anteriormente.

20 Entonces se puede valorar la tumorigenicidad de células aisladas basándose en la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- después del tratamiento con el anticuerpo anti-Notch2/3. En un ejemplo, se re-inyectan subcutáneamente 5,000, 1,000, 500 y 100 células madre de cáncer, aisladas, ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin- de ratones tratados con el anticuerpo de Notch2/3 versus tratados con anticuerpo de control en las almohadillas grasas mamarias de ratones NOD/SCID. De esta manera se determina la tumorigenicidad de células madre de cáncer basándose en el número de células inyectadas requeridas para formación tumoral consistente.

35 Ejemplo 7

Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 Retrasa la Recurrencia del Tumor *in vivo* Después del Tratamiento con Paclitaxel

40 Se inyectaron células de tumor de mama B51 (50,000 células por ratón) de forma subcutánea en la almohadilla grasa mamaria de ratones NOD-SCID. Los tumores se dejaron crecer durante 50 días hasta que han alcanzado un volumen promedio $\sim 100 \text{ mm}^3$. Se aleatorizaron los animales ($n = 10/\text{grupo}$) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo recibió un anticuerpo de control (1B711) a 10 mg/kg dos veces por semana y paclitaxel (Taxol) a 15 mg/kg dos veces por semana y el otro grupo recibió 59R1 a 10 mg/kg dos veces por semana y paclitaxel a 15 mg/kg dos veces por semana. Los volúmenes tumorales se midieron en los días indicados. Se llevaron a cabo los tratamientos durante 38 días hasta que los volúmenes tumorales han retrocedido a $\sim 50 \text{ mm}^3$, después de lo cual los tratamientos con paclitaxel se detuvieron y continuaron los tratamientos con anticuerpo durante la duración del experimento.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Se observó que los tumores recurren más rápidamente en el grupo control en comparación al grupo tratado con 59R1.

50 Ejemplo 8

Anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3 Disminuye la Frecuencia de Células Madre de Cáncer en un Tumor *in vivo*

55 Se pueden usar los ensayos de dilución limitante (LDA) para valorar el efecto de un agente de unión a Notch en células madre de cáncer de tumor sólido y en la tumorigenicidad de un tumor que comprende las células madre de cáncer. Los ensayos se pueden entablar para determinar la frecuencia de células madre de cáncer en tumores de animales tratados con el agente de unión a Notch u otro agente y comparar esa frecuencia a la frecuencia de las células madre de cáncer en tumores de animales de control.

60 Se usó un LDA para valorar el efecto en la tumorigenicidad de los tumores de mama B51 que se trataron con la combinación de anticuerpo de control (1B711) más paclitaxel (Taxol) o para tratar la combinación de 59R1 y paclitaxel, como se describe anteriormente en el ejemplo 7. Además, mediante LDA también se determinó el efecto del tratamiento de tumores de mama B51 con el anticuerpo de control solo o con 59R1 solo. Las dosis de los anticuerpos y de paclitaxel y el programa de dosificación para el grupo de anticuerpo de control y el grupo de 59R1 fueron los mismos que se describe en el Ejemplo 7, anterior para los otros dos grupos de tratamiento. Después de tres dosis de anticuerpos y/o paclitaxel, los tumores se recolectaron, se procesaron y se disociaron en células

individuales. Las células tumorales humanas se aislaron de las células tumorales de xenoinjerto por incubación con anticuerpos de ratón biotinilados (dilución de α -CD45 de ratón-biotina 1:200 y dilución de α -H2Kd de ratón-biotina 1:100, BioLegend, San Diego, CA) sobre hielo durante 30 minutos, seguido por la adición de cuentas magnéticas marcadas con estreptavidina y la remoción de las células del ratón con la ayuda de un imán. Las células humanas en la suspensión se recolectaron y contaron.

Una titulación en serie de células (30, 90, 270 y 810 células) de cada uno de los cuatro grupos de tratamiento se inyectó en una mezcla 1:1 (v/v), de amortiguador de FACS y Matrigel en un nuevo conjunto de ratones NOD-SCID ($n = 10/\text{grupo}$). Los tumores se dejaron crecer durante 72 días. En todos los grupos se determinó el porcentaje de ratones con tumores detectables. Entonces se calculó la frecuencia de células madre de cáncer usando el software L-CalCMR (StemCell Technologies Inc.; downloadable from www.stemcell.com/search/default.asp).

Los resultados se muestran en la Figura 7. La frecuencia de las células madre de cáncer en el tumor en los ratones tratados con control ("Control") se determinó que es 1:66. La frecuencia de las células madre de cáncer en el tumor en los ratones tratados con paclitaxel ("Taxol") se mostró que es de 1:25, indicado que el tratamiento con paclitaxel ha incrementado realmente la frecuencia de las células madre de cáncer en el tumor por más de dos veces con relación al control. Por otra parte, el tratamiento con anticuerpo 59R1, ya sea solo ("59R1") o en combinación con paclitaxel ("Taxol+59R1"), redujo la frecuencia de células madre de cáncer en los tumores. El anticuerpo 59R1 también redujo la frecuencia de células madre de cáncer en los tumores de mama por más de dos veces con relación al control. El tratamiento con la combinación del anticuerpo 59R1 y paclitaxel redujo la frecuencia de células madre de cáncer en el tumor por más de aproximadamente dos veces con relación al tratamiento con 59R1 solo ($p < 0,0001$), por aproximadamente 4,5 veces con relación al tratamiento con el anticuerpo de control, y por aproximadamente doce veces con relación al tratamiento con paclitaxel solo. Estos resultados indican que el tratamiento con el anticuerpo 59R1 es efectivo en la reducción de la tumorigenicidad de un tumor de mama, ya sea dado solo o en combinación con paclitaxel, aunque el tratamiento con paclitaxel solo tenga el efecto opuesto.

Ejemplo 9

Tratamiento *in vivo* Adicional de Tumores Usando Anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3

Se inyectaron células de tumor pancreático PN4 (50,000 células por ratón) de forma subcutánea en la región del flanco de ratones Nod-Scid. Los tumores se dejaron crecer durante 27 días hasta que han alcanzado un volumen promedio de $\sim 120 \text{ mm}^3$. Los animales se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento ($n = 10/\text{grupo}$) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo recibió un anticuerpo de control (1B711) a 10 mg/kg dos veces por semana, un grupo recibió gemcitabina a 40 mg/kg una vez por semana más el anticuerpo de control a 10 mg/kg dos veces por semana, un grupo recibió 59R1 a 10 mg/kg dos veces por semana, y el cuarto grupo recibió la combinación de 59R1 a 10 mg/kg dos veces por semana y gemcitabina 40 mg/kg una vez por semana. Los volúmenes tumorales se midieron en los días indicados. Los resultados se muestran en la Figura 8. El crecimiento tumoral se encontró que se inhibe por la combinación de 59R1 y gemcitabina ($p < 0,001$).

De forma subcutánea se inyectaron células de tumor de melanoma M4 (10,000 células por ratón) en la región de flanco de ratones NOD-SCID. Los tumores se dejaron crecer durante 25 días hasta que han alcanzado un volumen promedio de $\sim 80 \text{ mm}^3$. Los animales se aleatorizaron en grupos de tratamiento ($n = 10/\text{grupo}$) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo recibió un anticuerpo de control (1B711) a 10 mg/kg dos veces por semana y un grupo recibió 59R1 a 10 mg/kg dos veces por semana. Los volúmenes tumorales se midieron en los días indicados. Los resultados se muestran en la Figura 9. El crecimiento del tumor se encontró que se inhibe por 59R1.

Se inyectaron de forma subcutánea células de tumor de colon C28 (10,000 células por ratón) en la región de flanco de ratones NOD-SCID. Los tumores se dejaron crecer durante 24 días hasta que han alcanzado un volumen promedio de $\sim 130 \text{ mm}^3$. Los animales se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento ($n = 10/\text{grupo}$) y se iniciaron los tratamientos. Un grupo recibió un anticuerpo de control (1B711) a 10 mg/kg dos veces por semana, un grupo recibió irinotecan a 7,5 mg/kg una vez por semana más el anticuerpo de control en 10 mg/kg dos veces por semana, un grupo recibió 59R1 a 10 mg/kg dos veces por semana, y el cuarto grupo recibió la combinación de 59R1 a 10 mg/kg dos veces por semana e irinotecano a 7,5 mg/kg una vez por semana. Los volúmenes tumorales se midieron en los días indicados. Los resultados se muestran en la Figura 10. El crecimiento del tumor se encontró que se inhibe por 59R1 solo con relación al grupo de anticuerpos de control y por la combinación de 59R1 e irinotecano con relación al grupo de irinotecano.

El anticuerpo IgG2 59R1 también se probó *in vivo* en las líneas de xenoinjerto de tumor de mama OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13 y UM-T1, la línea de xenoinjerto de tumor de páncreas OMP-PN8, y la línea de xenoinjerto de el tumor de colon OMP-C8. Estas líneas de xenoinjerto de tumor se establecieron al adherirse a los procedimientos descritos en Al-Hajj *et al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EUA 100:3983-3988. Se usaron ratones NOD/SCID hembras inmunocomprometidos de 70-10 semanas de edad para el establecimiento de los xenoinjertos de tumor de mama y se usaron ratones NOD/SCID machos para los modelos de tumores OMP-Pn8 y OMP-C8 (Harlan, Indianápolis, Indiana). El anticuerpo IgG2 59R1 también se probó *in vivo* a un modelo de xenoinjerto de tumor de colon Colo-205. Ratones *bg/un XID* hembras inmunodeficientes en un antecedente de Swiss CD-1 se usaron para el modelo de

tumor de xenoinjerto Colo-205. En el caso de modelos de cáncer de mama, se tienen que implantar comprimidos de estrógeno de liberación lenta (0,36 mg). Los ratones se inyectaron de manera subcutánea en el flanco derecho con 50,000 (OMP-B34, OMP-B39, OMP-B44, PE13 y UM-T1) o 1×10^7 (Colo-205) células viables, respectivamente, en una mezcla de PBS (sin magnesio o calcio) y Matrigel en una relación 1:1. El volumen total inyectado por ratón fue de 200 μ l con 50 % que es Matrigel. Una vez que el tumor ha alcanzado un tamaño entre 65 a 200 mm^3 , los ratones se aleatorizaron. Los anticuerpos se administraron de manera semanal y los tumores se midieron dos veces por semana. Se uso LZ1 (un anticuerpo humano que reconoce lizozima) o 1B711 (un anticuerpo IgG1 murino que reconoce el hapteno trinitrofenol) como un anticuerpo de control para el tratamiento de cada tipo de tumor. Se calculó el volumen tumoral como se describe por Al-Hajj *et al.* (2003). Los datos se expresan como la media y la media \pm S.E.M. Las medias de los grupos se compararon usando la prueba t, no apareada, bilateral de Student. Los valores de probabilidad (P) de $<0,05$ se interpretaron como significativamente diferentes. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Microsoft EXCEL y Graph Pad PRISM.

Los resultados de los experimentos *in vivo* adicionales en o de los xenoinjerto Colo205, C8, PNA, B34, B39, B44, PE13 y T1 se muestran en las Figuras 11A-11H, respectivamente. Como se muestra en la Figura 11A, la monoterapia con el anticuerpo 59R1 inhibió de forma significativa el crecimiento del tumor Colo205 con relación al anticuerpo de control (LZ1) ($p < 0,01$). La terapia de combinación con 59R1 más el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (AVASTIN) proporcionó una inhibición aún mayor del crecimiento tumoral ($p < 0,001$) que ya sea 59R1 o bevacizumab solos. En otro modelo de xenoinjerto colorrectal, C8, el 59R1 se mostró igualmente que inhibe el crecimiento tumoral con relación al anticuerpo de control LZ1 (Figura 11B). De manera similar, se encontró que 59R1 inhibe el crecimiento de tumor pancreático (con relación al anticuerpo de control) en el modelo de xenoinjerto PN8 (Figura 11C). También se mostró que 59R1 inhibe el crecimiento de tumor de mama con relación a un anticuerpo de control en cada uno de los cinco modelos de xenoinjerto de cáncer de mama B34 (Figura 11D), B39 (Figura 11E), B44 (Figura 11F) y PE13 (Figura 11G). Igualmente se encontró que anticuerpo 59R1 es efectivo en inhibir el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de mama T1 (Figura 11H), aunque solo fue efectivo en la presencia de estrógeno, a pesar de que T1 es un tumor negativo a receptor de estrógeno.

Ejemplo 10

Efecto de Tratamiento con Anticuerpos 59R1 anti-Notch2/3 en la Regulación Génica en Modelos de Tumor de Xenoinjerto

Mediante análisis de microarreglo se analizaron los niveles de expresión génica en varios modelos de tumor de xenoinjerto tratados con el anticuerpo IgG2 59R1. Se realizó el análisis del perfilado de expresión génica global en el microarreglo Affymetrix HG-U133, plus 2,0 (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se aislaron tres muestras independientes de RNA de tumores enteros de xenoinjerto de los grupos control y de tratamiento, y se hibridizaron a los microarreglos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó el ajuste de fondo de arreglo escaneado y la normalización de la intensidad de la señal con el algoritmo GCRMA en el software bioconductor de fuente abierta (www.bioconductor.org). El nivel de expresión de cada gen se normalizó por transformación con puntuación z a través de las muestras en los grupos de control (CTRL) y de tratamiento (59R1). Los genes diferencialmente expresados ($p < 0,05$ y cambio en veces $> 2,0$) entre los dos grupos se identificaron con la prueba t de Bayesian (Baldi *et al.*, 2001, *Bioinformatics*, 17:509-519). Los patrones de expresión de los genes diferencialmente regulados, asociados, seleccionados en los modelos seleccionados de xenoinjerto de tumor (Colo205, B44, PE13 y T1) se muestran en la Tabla 5 posterior. El valor P (PVal) de cada gen es la probabilidad de regulación significativa del gen por 59R1 por probabilidad usando la prueba t de Bayesian. Varios genes que incluyen los genes que codifican para el regulador de la señalización 5 de la proteína G (RGS5), Notch3 y la proteína de peludo/mejorador de división relacionada con el motivo YRPW (HEYL) se muestra que se reducen significativamente la expresión en el estroma de los ratones tratados con 59R1 con relación a los ratones de control. (En contraste, estos genes particulares que codifican para RGS5, Notch3 y HEYL no se encuentran que reducen significativamente en la expresión en las células humanas de los tumores).

Tabla 5. Genes diferencialmente expresados en estroma de tumores tratados con 59R1

Gen	Colo205		B44		PE13		T1	
	Veces	pVal	Veces	pVal	Veces	pVal	Veces	pVal
1420942_s_at (Rgs5)	-5,52	7,65E-07	-2,43	5,59E-04	-4,23	2,86E-05	-1,18	9,82E-04
1417466_at (Rgs5)	-3,39	6,62E-07	-2,22	3,11E-04	-4,03	1,31E-10	-1,99	4,11E-04
1420941_at (RgsS)	-5,10	1,66E-03	-2,09	1,18E-03	-2,99	1,35E-05	-1,97	2,07E-03
1421964_at (Notch3)	-3,26	3,70E-06	-2,03	2,30E-03	-1,91	1,67E-03	-1,01	8,86E-01
1416286_at (Rgs4) 1	-3,08	2,69E-03	-1,57	3,84E-02	-1,83	6,71E-05	-1,13	4,47E-01

1434141_at (Gucyla3)	-2,49	2,87E-03	-1,74	1,07E-02	-4,18	1,49E-07	1,20	5,95E-01
1459713_s_at (Tmem16a)	-1,90	1,90E-03	-1,70	1,01E-02	-7,28	9,89E-10	-2,14	1,79E-04
1420872_at (Gucylb3)	-1,94	1,90E-02	-1,65	7,68E-03	-3,06	8,52E-10	-1,01	7,13E-01
1422789_at (Aldh1a2)	-1,73	1,20E-02	-4,92	2,42E-08	-2,17	1,58E-04	-2,16	9,27E-04
1419302_at (Heyl)	-3,28	5,61E-03	-1,12	2,36E-01	-1,77	5,72E-04	-1,07	2,39E-02
1451501_a_at (Ghr)	-1,83	1,69E-02	-2,24	2,71E-04	-1,66	8,90E-04	-1,12	3,38E-01
1417714_x_at (Hba-a1/Hba-a2)	-8,37	2,49E-02	-2,56	4,63E-04	-1,92	1,06E-02	1,42	9,24E-01
1428361_x_at (Hba-a1/Hba-a2)	-8,91	1,93E-02	-2,42	1,08E-03	-1,73	4,27E-02	1,73	4,67E-01
1452590_a_at (Plac9)	-1,61	1,07E-02	-1,64	1,22E-02	-1,62	6,17E-03	1,20	7,36E-01
1449632_s_at (Fkbp10)	-1,72	1,69E-02	-1,57	1,12E-02	-1,63	1,80E-04	1,07	5,97E-01
1449280_at (Esm1)	2,07	1,06E-02	1,55	3,48E-02	1,56	4,35E-02	1,18	2,44E-01
1418829_a_at (Eno2)	1,79	2,92E-02	1,71	1,02E-02	1,54	5,43E-03	1,29	9,92E-02

Los niveles de expresión en el estroma de los modelos de xenoinjerto la Colo205, B29, B34, B44, PE13, T1 (sin tratamiento con estrógenos), T1 (con tratamiento con estrógenos), C8 y PN8 de genes seleccionados que se han identificado en el análisis de microarreglo como que están regulados por el tratamiento con 59R1 (*hey1*, *notch3*, *rgs5*, *angpt1* y *angpt2*) se analizaron adicionalmente por análisis TaqMan^{MR}. Los resultados se muestran en las Figuras 12A (*hey1*), 12B (*notch3*), 12C (*rgs5*), 12D (*angpt1*) y 12E (*angpt2*).

Los resultados del análisis TaqMan^{MR} confirman que *notch3* y *rgs5* son reducen en expresión en el estroma de cada uno de los varios tipos de tumor en respuesta al tratamiento con 59R1 (con relación al control) (Figuras 12B y C). RGS5 es un marcador bien conocido de pericitos y células del músculo liso vascular (Berger *et al.*, 2005, *Blood*, 105:1094-1101; Lovschall *et al.*, 2007, *Int. J. Dev. Biol.*, 51:715-721; Cho *et al.*, 2003, *FASEB J.*, 17:440-2). Se ha identificado Notch3 como que se coexpresa con RGS5 en pericitos durante la angiogénesis y que juega un papel importante en la regulación del destino de los pericitos y células del músculo liso vascular (Lovschall *et al.*, 2007, *Int. J. Dev. Biol.*, 51:715-721; Domenga *et al.*, 2004, *Genes & Dev.*, 18:2730-2735; Sweeney *et al.*, 2004, *FASEB J.*, 18:1421-3; Morrow *et al.*, 2005, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 289:C1188-C1196).

Además, también se confirmó que *hey1* se reduce en expresión en el estroma de cada uno de los modelos de xenoinjerto excepto B34 (Figura 12A). HeyL corresponde a la familia de Hey de factores de transcripción de etapa posterior de la señalización de Notch (Hey1, Hey2 y HeyL). La reducción de la expresión de *hey1* por 59R1 sugiere que el anticuerpo 59R1 afecta directamente la señalización de Notch al reducir la expresión de *hey1*.

También se determinó que la *angiopoyetina-1* (*angpt1*) y *angiopoyetina-2* (*angpt2*) se reducen en expresión en el estroma de varios modelos de cáncer de mama (Figuras 12D y E). ANGPT1 y 2 (angiopoyetina 1 y 2) son ligandos para los receptores TIE 1 y 2. Los receptores TIE, al igual que VEGF, son moléculas cruciales señalización en el proceso de neoangiogénesis (Jones *et al.*, 2001, *Nature Reviews*, 2:257-267).

De manera notable, sin embargo, *angpt1* y *angpt2* se redujeron en expresión en el estroma del modelo T1 cuando se usó tratamiento con estrógeno ("T1 e"), condiciones bajo las cuales fue efectivo el tratamiento con 59R1 contra el crecimiento tumoral, pero no en el estroma del mismo modelo, en la ausencia de tratamiento con estrógeno ("T1 ne"), las condiciones bajo las cuales el tratamiento con 59R1 fue inefectivo contra el crecimiento tumoral (ver Ejemplo 9, anteriormente). De esta manera, el efecto de 59R1 en la reducción de la expresión de angiopoyetina 1 y angiopoyetina 2 en el estroma del tumor en T1 se anuló en la ausencia del tratamiento con estrógeno. Una posible explicación de este efecto es que, en la ausencia de tratamiento con estrógeno, los niveles de los factores de crecimiento, angiopoyetina 1 y angiopoyetina 2 en el estroma T1 no se elevaron de manera suficiente para proporcionar disminuciones medibles en los niveles de expresión en el tratamiento con el anticuerpo 59R1. Se ha mostrado que el estrógeno tiene efectos significativos en el microambiente tumoral (Banka *et al.*, 2006, *Cancer Res.* 66:3667-3672). Una posible explicación de estos datos es que el estrógeno conduce a una dependencia del tumor a la señalización de ANGPT2, que entonces conduce a sensibilidad al tratamiento con 59R1.

Ejemplo 11

Anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3 Induce de Forma Significativa Hipoxia en Tumores de Colon y Mama

5 Se realizó la tinción para regiones hipóxicas en tumores de colon Colo-205 y tumores de mama PE-13 que se han tratado con ya sea con el anticuerpo IgG2 59R1 o con el anticuerpo de control 1B711. La tinción se realizó como se describe en Ridgway *et al.*, 2006, *Nature* 444:1083-1087. De forma breve, para medir la hipoxia, una hora antes del sacrificio a 60 mg/kg se inyectó de manera intraperitoneal pimonidazol-clorhidrato (HypoxyProbe, NPI, Burlington, MA), que forma aductos de proteína de larga vida a presión parcial de oxígeno menos de aproximadamente 10 mm de Hg. Los tumores entonces se procesaron para análisis histológico, y las secciones tumorales se tiñeron usando anticuerpo-pimonidazol siguiendo el protocolo del fabricante (NPI). Se tomaron fotografías usando un microscopio BX51 (Olympus, Center Valley, PA).

15 Se encontró que las células tumorales viables estuvieron igualmente presentes en tumores tratados con 1B711 como con 59R1, como se indica por una tensión de DAPI relativamente uniforme y densa (datos no mostrados). El número de células positivas CD31 también permaneció sin cambio, sugiriendo que el número de células endoteliales no se afectó por el tratamiento con 59R1. Sin embargo, en los tumores Colo-205 y PE13 tratados con 59R1, las regiones hipóxicas (como se detecta por el anticuerpo anti-pimonidazol) fueron significativamente más pronunciadas que en los tumores tratados con 1B711 (datos no mostrados). Se usó F(ab')₂ anti-rata de cabra conjugado con AF594 para detectar el anticuerpo anti-CD31 y se usó el anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con FITC para detectar el anticuerpo anti-pimonidazol.

Ejemplo 12

25 Tumores de Mama que Comprende Supresiones en el Gen del Supresor Tumoral PTEN, son Sensibles al Tratamiento con 59R1

30 Se prepararon muestras de ADN de células tumorales de cáncer de mama xenoinjerto. Antes del aislamiento del ADN, se agotaron células de estroma de ratón en los tumores de xenoinjerto usando cuentas magnéticas conjugadas con anticuerpos específicos de células de ratón. Las muestras de ADN purificadas se hibridaron al genechip Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6,0 (Affymetrix, Santa Clara, CA), que tiene más de 946,000 sondas para la detección de variaciones del número de copia (CNV), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cambios del estado de número de copia se estimaron por el modelo de Hidden Markov (HMM) y sus variaciones (CNV) de cada muestra se obtuvieron por análisis de segmentación de rango usando Hapmap270 como línea base. Debido al ruido inherente del arreglo, se usaron relaciones -0,5 y -1,0 log₂ como los cortes de la supresión heterocigota y la supresión homocigota bajo el umbral de significancia <1,0x10⁻⁶ y número mínimo de sondas por segmento =5.

40 La Figura 13 muestra el exón, la distribución de la sonda Affymetrix, y las supresiones en el gen del supresor tumoral, homólogo de fosfatasa-tensina (PTEN) en el cromosoma 10. Los tumores de mama B29, B34, B37, B40, B51, T2, T3 y T6 se encontraron que tienen intacto el gen de PTEN en sus genomas. El gen de PTEN se determinó que tiene supresiones homocigóticas en el tumor B39, en tanto que los tumores B44, PE13 y T1 se determinó que tienen supresiones heterocigotas de este gen. Como se analiza anteriormente, se determinó que 59R1 tiene eficacia anti-tumor en cada uno de estos cuatro tumores de mama que comprenden supresiones homocigotas o heterocigotas de PTEN. Estos resultados sugieren que los tumores, especialmente tumores de mama, que tienen supresiones homocigotas o heterocigotas de PTEN pueden ser particularmente adecuados para el tratamiento con un anticuerpo anti-Notch2/3 tal como 59R1.

Ejemplo 13

50 Caracterización de Anticuerpos 59R5

Se identificó un anticuerpo humano adicional 59R5 que se une de manera específica a Notch2 humano y Notch3 humano. Las secuencias de la cadena pesada y de la cadena ligera se proporcionan en SEC ID N°: 49 y SEC ID N°: 18, respectivamente. La región variable de cadena pesada se proporciona en SEC ID N°: 50 y la región variable de cadena ligera se proporciona en SEC ID N°: 13. La secuencia de CDR3 de cadena pesada de 59R5 comprende SIFYTT, SEC ID N°: 51. Las otras secuencias de CDR de 59R5 son idénticas a 59R1. El análisis de Biacore de las afinidades de unión de 59R1 y 59R5 indicaron que 59R5 tiene propiedades similares de unión tanto como para Notch2 como para Notch3 como 59R1. Ambos anticuerpos se unen a los receptores Notch2 y Notch3 de humano y ratón con afinidad sub-nanomolar (ver Tabla 6).

Tabla 6

Constantes de Disociación de IgG (K _D , nM)							
	m-Notch1	h-Notch1	m-Notch2	h-Notch2	m-Notch3	h-Notch3	h-Notch4
59R1	>10	>10	0,65	0,05	0,32	0,19	NB
59R5	>10	>10	0,26	0,05	0,29	0,22	NB

Se determinó que 59R5 tiene actividad similar al bloquear la señalización de Notch2 y Notch3 como 59R1. Se determinó la activación de receptor en ensayos basados en luciferasa. Células tumorales PC3 se transfectaron de manera transciente con un receptor Notch humano o de ratón (Notch2 humano, Notch2 murino, Notch3 humano o Notch3 murino) y la construcción de indicador inducible GFP. Se incubaron células transfectadas con diferentes concentraciones del anticuerpo 59R1 o 59R5 en la presencia de proteína DLL4-Fc pasivamente inmovilizada. Se determinó la activación del receptor Notch al medir la actividad de luciferasa. Como se muestra en la Figura 15A, 59R5 bloqueó la activación inducida por ligando de la señalización del receptor Notch2 humano, Notch2 murino, Notch3 humano y Notch3 murino a niveles similares como 59R1.

Se terminó el epítipo de unión de 59R5. Como se describió en el Ejemplo 3 para el análisis del anticuerpo 59R1, se crearon varios mutantes puntuales dentro de Notch1 de longitud completa, convirtiendo los residuos dentro de EGF10 a los correspondientes aminoácidos en Notch2 humano. Se generaron mutantes en las secuencias de Notch de longitud completa por mutagénesis QuikChange^{MR} (Stratagene) y se verificaron por secuenciación. Células HEK 293 se transfectaron de manera transciente con vectores de expresión que codifican para Notch2 humano, Notch1 humano o Notch1 humano con los residuos 382-386 mutados a los correspondientes residuos de Notch2 humano. Las células también se co-transfectaron con un plásmido que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) para marcar aquellas células que recibieron plásmido transfectado. Las células se incubaron con 59R1 o 59R5 y anticuerpo secundario fluorescente y luego se examinaron por FACS. Se detectaron 59R1 y 59R5 por anticuerpo específico de Fc-gamma anti-humano de cabra conjugado con PE (Jackson Immunochemicals, #109-116-170). Como se muestra en la Figura 15B, 59R5 se unió Notch2 y no se unió a Notch1. Sin embargo, cuando los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 385-389 de Notch2 se sustituyeron en Notch1, 59R5 fue capaz de unirse a Notch1 mutado. Esto sugirió que al menos uno o más aminoácidos necesarios para la unión de 59R5 a Notch2 humano estaban colocados dentro de los aminoácidos 385-389 (residuos en secuencia de hNotch2 en cuadro mostrado en la Figura 14A) y sugieren que 59R5 se une al mismo epítipo como 59R1, o un epítipo similar a, o que se traslapa con, el epítipo de 59R1.

Ejemplo 14

Tratamiento *in vivo* para Tumores que Usan el Anticuerpo 59R5 de Notch2/3

En una modalidad, se inyectaron ratones NOD/SCID con células de tumor de mama PE13. Los ratones se trataron con el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3, anticuerpos 59R5 anti-Notch2/3 o anticuerpos de control. Los anticuerpos se dosificaron a 15 mg/kg una vez por semana en un modo "preventivo" donde se inició la dosificación dos días después de la inyección celular. La Figura 16A muestra que el tratamiento con 59R5 inhibió el crecimiento tumoral por más de 80 %, similar a los efectos vistos en 59R1.

En otra modalidad, los ratones NOD/SCID se inyectaron con células de tumor de colon C28. Los ratones se trataron con el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3, anticuerpo 59R5 anti-Notch2/3 o anticuerpo de control. Los anticuerpos se dosificaron a 15 mg/kg una vez por semana en un modo "preventivo" donde la dosificación se inició dos días después de la inyección celular. La Figura 16B muestra que tanto 59R1 como 59R5 inhibieron el crecimiento de tumores de colon C28.

En otra modalidad, se inyectaron ratones NOD/SCID con células de tumor de colon con Colo205. Los ratones se trataron con el anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3, anticuerpo 59R5 anti-Notch2/3 o anticuerpo de control. Los anticuerpos se dosificaron a 15 mg/kg una vez por semana después de que se han establecido los tumores. La Figura 16C muestra que tanto 59R1 como 59R5 inhibieron el crecimiento de tumores de colon Colo208 a niveles similares.

Ejemplo 15

Tratamiento *in vivo* de Tumores Usando el Anticuerpo 59R5 de Notch2/3 en Tratamiento de Combinación

En una modalidad, se inyectaron ratones NOD/SCID con células de tumor pancreático PN8. Los tumores se dejaron crecer durante aproximadamente 33 días hasta que han alcanzado un volumen tumoral promedio de 150 mm³. Los ratones se trataron con gemcitabina a 20 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas en combinación con el anticuerpo de control, anticuerpo 59R1 anti-Notch2/3, o anticuerpo 59R5 anti-Notch2/3. Como se muestra en la Figura 17A, el anticuerpo 59R5 inhibió el crecimiento tumoral a un nivel similar como el anticuerpo 59R1 y que el

tratamiento de combinación prolongó la recurrencia del tumor más tiempo que gemcitabina sola.

En una modalidad, para evaluar el efecto de 59R5 en células madre de cáncer, se llevó a cabo un estudio de recurrencia de tumor en el modelo de tumor de mama PE13. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células de tumor de mama PE13. Los tumores se dejaron crecer durante 40 días antes de que se iniciaran los tratamientos. Los ratones se trataron con taxol a 15 mg/kg dos veces por semana durante 5 semanas, en combinación con ya sea el anticuerpo de control o el anticuerpo 59R5 anti-Notch 2/3. Después de 5 semanas, se detuvieron los tratamientos con taxol y se continuaron los tratamientos con anticuerpo. Se observó que 59R5 retrasa de forma significativa la recurrencia del tumor después del tratamiento a altas dosis con taxol (Figura 17B). Estos resultados sugieren que el tratamiento con 59R5 reduce la frecuencia de células madre de cáncer.

En la Tabla 7 se muestra un resumen de la actividad *in vivo* de 59R1 y 59R5 como se describe en las modalidades precedentes. Los volúmenes tumorales y los valores p para cada experimento se muestran con relación al grupo control. Los estudios con PE13, C28 y Colo205 se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 14. Se llevaron a cabo estudios con PN8 como se describe anteriormente. Para el experimento de PN8, el control es gemcitabina sola y valores para 59R1 y 59R5 son las combinaciones con gemcitabina. Los anticuerpos se dosificaron una vez por semana a 15 mg/kg para todos los experimentos.

Tabla 7

	PE13		C28		Colo205		PN8	
	Vol tumoral	p valor						
59R1	0,25	<0,0001	0,29	<0,0001	0,68	0,003	0,27	0,026
59R5	0,18	<0,0001	0,38	<0,0001	0,61	0,001	0,11	0,036

Ejemplo 16

Regulación de la Expresión Génica en Tumores Después del Tratamiento con 59R5

Para determinar si 59R5 y 59R1 estuvieron funcionando por los mismos mecanismos *in vivo*, se examinó la expresión de genes objetivo clave en células tumorales y estroma tumoral. Se valoró la expresión génica por PCR cuantitativa en células de tumor PE13 y células del estroma. En la Figura 18 se muestran los niveles de expresión génica con relación al grupo tratado con anticuerpo de control. 59R1 y 59R5 regularon la expresión de HeyL, Notch3 y RGS5 murinos en células del estroma a un grado similar (panel izquierdo). Se observó el mismo patrón de regulación en tumores C28 (datos no mostrados). De esta manera, el mecanismo de acción identificado anteriormente 59R1 en la regulación de genes en el tumor de estroma crítico para la función de la vasculatura tumoral y los pericitos se retuvo por 59R5. De manera similar, 59R5 y 59R1 regularon la expresión de los genes humanos ID4, EDNRA y EGLN3 en las células tumorales al mismo grado (panel derecho).

Diferentes de otros miembros de esta familia génica, ID4 se sub-expresa en general en tumores, y se ha mostrado que ID4 es un supresor tumoral en cáncer de mama que frecuentemente se silencia por metilación. La pérdida de la expresión ID4 se correlaciona con una peor prognosis en pacientes con cáncer de mama (Noetzel *et al.*, 2008, *BMC Cancer* 8:154). De esta manera, el favorecimiento de la expresión de ID4 en células de tumor de mama PE13 puede ser parte del mecanismo anti-tumor de anti-Notch2/3. EDNRA es el gen que codifica para receptor de endotelina, que promueve el crecimiento de tanto células endoteliales como tumorales y estimula la actividad metastática de las células tumorales (Bagnato y Rosano 2008, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40:1443-51). EGLN3 (también conocido como HIF-3 α) es un gen inducible por hipoxia. La inducción de EGLN3 por anti-Notch2/3 es consistente con la interrupción de la vasculatura funcional en los tumores tratados. Estos datos indicaron que fueron muy similares las actividades biológicas y el mecanismo de acción de 59R1 y 59R5.

La Tabla 8 muestra los resultados de un análisis de microarreglo de tumores PE13 tratados con 59R1 y 59R5. Los números son los valores medios de expresión diferencial para animales tratados versus animales de control, con 3 animales por grupo.

Tabla 8

59R1		59R5		Símbolo	Título génico
Veces	pVal	Veces	pVal		
-5,10	3,21E-05	-3,00	1,10E-03	Foxc2	Caja forkhead C2
-4,40	1,26E-05	-2,46	7,45E-04	Hey2	peludo/mejorador de división relacionado con motivo 2 de YRPW
-4,32	8,03E-06	-2,14	1,00E-04	Rgs5	Regulador de señalización 5 de proteína G

-3,33	5,59E-04	-2,79	3,18E-03	Heyl	peludo/mejorador de división relacionado con motivo 2 de YRPW
-2,71	4,80E-04	-2,90	1,02E-04	Rgs4	Regulador de señalización 4 de proteína G
-2,10	2,17E-04	-1,86	4,33E-05	Notch3	Homólogo 3 de gen Notch (Drosophila)
-1,92	3,16E-02	-2,35	3,43E-03	Mmp9	Metalopeptidasa 9 de matriz
2,36	3,06E-02	4,97	3,35E-02	Pdcd11g2	Ligando 2 de muerte celular programada 1
7,42	6,25E-07	2,80	2,07E-03	Gzma	granzima A

El análisis de microarreglo revela que 59R5, inhibió de forma significativa la ruta de Notch ($p < 0,01$) como se mide por la expresión génica (por ejemplo, *Foxc2*, *Hey2*, *Hey1*, *Notch3*). Estos resultados fueron comparables a 59R1. *Foxc2* es un objetivo de etapa posterior de la ruta Hedgehog y está comprendido en la diferenciación celular. También se expresaron de manera similar genes adicionales comprendidos en la apoptosis (por ejemplo, granzima A) y remodelado de tejido asociado tumor (MMP-9) entre 59R1 y 59R5. Estos datos sugirieron que son muy similares las actividades biológicas y el mecanismo de acción de 59R1 y 59R5.

Ejemplo 17

Producción de Anticuerpos Adicionales de Notch2 y/o Notch3 Producción de Antígeno

En ciertas modalidades, para la producción de anticuerpos se generaron como antígenos fragmentos de polipéptido recombinante del dominio extracelular de Notch2 humano o Notch3 humano. Por ejemplo, se puede usar tecnología de ADN recombinante normal para aislar un polinucleótido que codifica para los aminoácidos 1-493 de Notch2 (SEC ID N°: 33), que abarca EGF 1-12. Este polinucleótido se puede ligar en cuadro N-terminal a ya sea una marca Fc humana o marca de histidina y clonar en un vector de plásmido de transferencia para expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Se pueden usar protocolos normales de transfección, infección y cultivo celular para producir células insectiles recombinantes que expresan el correspondiente polipéptido de Notch2 (SEC ID N°: 34). (O'Reilly *et al.*, 1994, de Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

La escisión de la secuencia de señal endógena de Notch2 humano se aproximó usando software de predicción de escisión SignalP3,0, sin embargo, el punto de escisión *in vivo* real puede diferir por un par de aminoácidos en cualquier dirección. La escisión prevista de Notch2 está entre los aminoácidos 1 y 26, de esta manera la proteína de antígeno de Notch2 comprende aproximadamente el aminoácido 27 hasta el aminoácido 493. Se puede purificar la proteína de antígeno de medio acondicionado de células de insecto usando cromatografía de afinidad de proteína A y Ni⁺⁺-quelato. La proteína purificada de antígeno entonces se dializa contra PBS (pH = 7), se concentra a aproximadamente 1 mg/ml, y se filtra estéril en preparación para inmunización.

Inmunización

Se pueden inmunizar ratones con proteína de antígeno de Notch2 o Notch3, purificada usando técnicas normales. La sangre de ratones individuales se puede examinar aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento de antígeno usando análisis de ELISA y FACS (descrito en detalle más adelante). Los animales con los más altos títulos de anticuerpo entonces se seleccionan para el repuesto final con antígeno después de lo cual se aíslan las del bazo para producción de hibridomas. Las células hibridoma se colocan en placa a una célula por concavidad en placas con 96 concavidades, y el sobrenadante de cada concavidad se examina por análisis de ELISA y FACS contra la proteína de antígeno. Se seleccionan varios hibridomas con el título alto de anticuerpo y se aumentan en escala en un cultivo estático de matraz. Los anticuerpos se purifican del sobrenadante de hibridoma usando cromatografía de proteína A o proteína G-agarosa y los anticuerpos se prueban por FACS como se describe más adelante.

Análisis de FACS

Para seleccionar anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, clones que reconocen la proteína de Notch2 (y/o Notch3) nativa, de superficie celular, se usa análisis de FAC. Se co-transfectan células HEK293 con vectores de expresión que codifican para un clon de ADNc de longitud completa de Notch2 y el marcador de la transfección GFP. Veinticuatro a cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se recolectan en suspensión y se incuban en hielo con anticuerpos anti-Notch2 (o anti-Notch3 o anti-Notch2/3) o IgG de control para detectar la unión de anticuerpo de fondo. Las células se lavan y los anticuerpos primarios se detectan con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a un cromóforo fluorescente. Las células marcadas se clasifican por FACS para identificar los anticuerpos anti-Notch2, anti-Notch3 o anti-Notch2/3 que reconocen de manera específica la expresión en superficie celular de la proteína de Notch2 y/o Notch3, nativa, de superficie celular.

Anticuerpos Quiméricos

Después de que se identifican los anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica un dominio de no unión a ligando de un receptor Notch, estos anticuerpos se modifican para superar la inmunorespuesta de anticuerpo anti-ratón de humano (HAMA) cuando se usan anticuerpos de roedor como agentes terapéuticos. Las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado se aíslan por RT-PCR de células de hibridoma y se ligan en cuadro a las regiones constantes de cadenas ligera kappa y cadena pesada de IgG1 humana, respectivamente, en vectores de expresión de mamífero. De manera alternativa, se usa un vector de expresión de Ig de humano tal como TCAE 5,3 que contiene los genes de las regiones constantes de cadena ligera kappa y cadena pesada de IgG1 de humano en el mismo plásmido (Preston *et al.*, 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Los vectores de expresión que codifican para las cadenas pesada y ligera quiméricas entonces se co-transfectan en células de ovario de hámster Chino (CHO) para producción de anticuerpos quiméricos. La inmunorreactividad y afinidad de los anticuerpos quiméricos se compara a anticuerpos murinos parentelas por ELISA y FACS.

Anticuerpos Humanizados

Puesto que los productos terapéuticos de anticuerpos quiméricos aún son frecuentemente antigénicos, la producción de una respuesta inmunitaria de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), anticuerpos quiméricos contra un receptor Notch2 o Notch3 puede requerir humanización adicional. Para generar anticuerpos humanizados, las tres secuencias cortas hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR), de los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo quimérico, descritos anteriormente, se manejan usando tecnología de ADN recombinante en la región menos variable de dominio variable de secuencias de cadena pesada y ligera de humano, respectivamente, y luego se clonan en un vector de expresión de mamífero para la expresión en células CHO. La inmunorreactividad y afinidad de los anticuerpos humanizados se compara a anticuerpos quiméricos parentales por ELISA y FACS. Adicionalmente, se puede usar mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., del anticuerpo humanizado.

Ejemplo 18

Ensayos *in vitro* Adicionales para Evaluar Anticuerpos Contra un Receptor Notch

Este ejemplo describe métodos para ensayos *in vitro* para probar la actividad de los anticuerpos generados contra un receptor Notch2 y/o Notch3 en la proliferación celular y citotoxicidad.

Ensayo de Proliferación

Se prueban anticuerpos contra Notch2 y/o Notch3 para su efecto en el crecimiento de células tumorales *in vitro* usando un ensayo basado en BrdU. Se cultivan células de tumor de mama agotadas de Lin-, recién dissociadas, en poco oxígeno durante entre 2-5 días. Las células entonces se cultivan a 20,000 células/concavidad con 2,5 µg/ml o 5,0 µg/ml de anticuerpo anti-Notch, IgG murina no específica de control, o sin anticuerpos durante tres días, seguido por marcación BrdU de 18 horas. Todos los experimentos se realizan con múltiples replica. Entonces se determina la capacidad de los anticuerpos anti-Notch para inhibir la proliferación celular en comparación a los anticuerpos de control.

Ensayo de Citotoxicidad Dependiente de Complemento

Se usan líneas de células de cáncer que expresan un receptor Notch2 y/o un receptor Notch3, o de manera alternativa, células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente que se hace pasar como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos, para medir la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), mediada por un anticuerpo contra receptor Notch2 y/o Notch3. Las células se cultivan en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con antibióticos y FBS al 5 % a 106 células/ml. Entonces las células suspendidas se mezclan con 200 µl de suero o suero inactivado con calor con anticuerpos contra un receptor Notch2 y/o Notch3 o anticuerpos de control en triplicado. Las mezclas celulares se incuban durante 1 a 4 horas a 37°C en 5 % de CO₂. Las células tratadas entonces se recolectan, se resuspenden en 100 µl de anexina V marcadas con FITC diluida en medio de cultivo y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. Cien µl de solución de yoduro de propidio (25 mg/ml) diluida en HBSS se añade y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se recolectan, se resuspenden en medio de cultivo y se analizan por citometría de flujo. La citometría de flujo de las células teñidas con FITC proporciona cuentas celulares totales, y la captación de yoduro de propidio por células muertas como un porcentaje de los números celulares totales se usa para medir la muerte celular en la presencia de suero y anticuerpos contra un receptor Notch2 y/o Notch3 en comparación a suero inactivado con calor y anticuerpos de control. De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos anti-Notch2/3 para mediar la citotoxicidad dependiente de complemento.

Ensayo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo

Se usan líneas de células de cáncer que expresan un receptor Notch2 y/o un receptor Notch3, o de manera alternativa, células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (descrito en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por un anticuerpo contra una receptor Notch2 y/o Notch3. Se suspenden células en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 libre de rojo fenol, complementado con antibióticos y 5 % de FBS a 106 células/ml. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica heparinizada por centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll-Paque para el uso como células efectoras. Entonces se mezclan las células objetivo (T) con las células efectoras PBMC (E) a relaciones de E/T de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 concavidades en la presencia de un receptor Notch2 o Notch3 o anticuerpos de control. Los controles incluyen incubación de células objetivo solas y células efectoras solas en la presencia de anticuerpo. Las mezclas celulares se incuban durante 1 a 6 horas a 37°C en el 5 % de CO₂. La lactato-deshidrogenasa (LDH) liberada, una enzima citosólica estable liberada en la lisis celular, entonces se mide por un ensayo colorimétrico (por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox96; Promega, Madison, WI). Los datos de absorbancia a 490 nm se recolectan con un lector normal de placas de 96 concavidades y se corrige el fondo. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula de acuerdo a la fórmula: % de citotoxicidad = 100 x (liberación de LDH experimental – liberación de LDH espontánea efectora – liberación de LDH espontánea objetivo) / (liberación de LDH máxima objetivo - liberación de LDH espontánea objetivo). De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos contra un receptor Notch2 y/o Notch3 para mediar la citotoxicidad celular dependiente anticuerpo.

Ejemplo 19

Producción de Anticuerpos Contra EGF10 (o EGF Equivalente) de Receptores Notch

La identificación de un anticuerpo que se une de manera específica a diez repeticiones de EGF de Notch2 y a la repetición correspondiente EGF de Notch3 (la novena repetición de EGF) que reduce el crecimiento tumoral en animales sugiere la importancia del dominio de no unión a ligando, y la décima repetición de EGF (o su equivalente), en particular, para terapias efectivas de cáncer. Para seleccionar como objetivo la repetición 10 de EGF (o EGF equivalente) en los miembros de la familia de receptores Notch, se producen y analizan anticuerpos contra EGF10 de Notch1, Notch2 o Notch4 o contra EGF9 de Notch3. De manera específica, se inmunizan ratones con antígenos que comprenden la décima repetición de EGF de Notch1 (SEC ID N°: 35); Notch2 (SEC ID N°: 36) o Notch4 (SEC ID N°: 38) o la novena repetición de EGF de Notch3 (SEC ID N°: 37). Los anticuerpos que reconocen a los receptores Notch específicos, así como los anticuerpos que reconocen diferentes combinaciones de los cuatro receptores Notch se identifican usando análisis por FACS de células HEK 293 transfectadas con cada receptor Notch como se describe en detalle anteriormente. Los anticuerpos que reconocen la décima repetición de EGF (o EGF equivalente) de dos miembros de la familia de receptores Notch se contemplan (por ejemplo anticuerpos que reconocen la EGF10 de Notch1 y la EGF10 de Notch2; la EGF10 de Notch1 y la EGF9 de Notch3; la EGF10 de Notch1 y la EGF10 de Notch4; la EGF10 de Notch2 y la EGF9 de Notch3; la EGF10 de Notch2 y la EGF10 de Notch4, o la EGF9 de Notch3 y la EGF10 de Notch4). Los anticuerpos que reconocen la décima repetición de EGF (o EGF equivalente) de tres miembros de la familia de receptores Notch igualmente se contemplan (por ejemplo, anticuerpos que reconocen la EGF10 de Notch1, EGF10 de Notch2 y EGF9 de Notch3; la EGF10 de Notch1, la EGF10 de Notch2, y la EGF10 de Notch4, o la EGF10 de Notch2, la EGF9 de Notch3 y la EGF10 de Notch4). Y se contemplan los anticuerpos que reconocen la décima repetición de EGF (o EGF equivalente) de cuatro miembros de la familia de receptores Notch (por ejemplo, anticuerpos que reconocen la EGF10 de Notch1, la EGF10 de Notch2, la EGF9 de Notch3 y la EGF10 de Notch4).

Ejemplo 20

Tratamiento de Cáncer Humano Usando Anticuerpos anti-Receptor Notch

Este ejemplo describe métodos para tratar cáncer usando anticuerpos contra un receptor Notch para seleccionar como objetivo tumores que comprenden células madre de cáncer y/o células tumorales en las cuales se ha detectado la expresión del receptor Notch.

La presencia de la expresión de marcador de células madre de cáncer se puede determinar primero de una biopsia de tumor. Bajo condiciones estériles se remueven células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer. En algunas modalidades, la biopsia de tejido entonces se congela fresca en nitrógeno líquido, se incrusta en O.C.T., y se corta en un criostato como secciones de 10 µm sobre portaobjetos de vidrio. De manera alternativa, la biopsia de tejido se fija en formalina, se incrusta en parafina, y se corta en un microtomo como sección de 10 µm sobre el portaobjetos de vidrio. Las secciones se incuban con anticuerpos contra un receptor Notch para detectar la expresión de la proteína. Adicionalmente, se puede determinar la presencia de células madre de cáncer. Las muestras de biopsia de tejido se cortan en pequeñas piezas, se trituran completamente usando cuchillas estériles, y las células se someten a digestión enzimática y trituración mecánica para obtener una suspensión celular individual. Entonces se incuban células tumorales disociadas con los anticuerpos anti-ESA, -CD44, CD24- y Lin-, para detectar las células madre de cáncer, y se determina la presencia de células madre tumorales ESA+, CD44+,

CD24-/bajo, Lin- por citometría de flujo como se describe en detalle anteriormente.

Los pacientes con cáncer cuyos tumores se diagnostican como que expresan un receptor Notch se tratan con anticuerpos anti-receptor Notch. Los anticuerpos monoclonales humanos y humanizados anti-receptor Notch, generados como se describe anteriormente se purifican y formulan con un portador farmacéutico adecuado en PBS para inyección. Los pacientes se tratan con los anticuerpos Notch una vez por 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 efectiva de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml y en ciertos casos entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml. El anticuerpo se puede administrar antes de, concurrente con, o después de regímenes normales de radioterapia o regímenes de quimioterapia usando uno o más agentes quimioterapéuticos, tal como paclitaxel, gemcitabina, irinotecano, oxaliplatina, fluorouracilo, leucovorin o estreptozocina. Los pacientes se monitorizan para determinar si ese tratamiento da por resultado una respuesta anti-tumor, por ejemplo, basada en la regresión tumoral, basada en la reducción en las incidencias de nuevos tumores, menor expresión de antígeno de tumor, números disminuidos de células madre de cáncer, u otros medios para evaluar la prognosis de la enfermedad.

Ejemplo 21

Producción de Anticuerpos Contra Repetición 4 de EGF de Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4

Para seleccionar como objetivo la repetición 4 de EGF en los miembros de la familia de receptores Notch, se analizan y producen anticuerpos contra la repetición 4 de EGF de Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4. De manera específica, se inmunizan ratones contra antígenos que comprenden la cuarta repetición de EGF de Notch1 (SEC ED NO: 41), Notch2 (SEC ID NO: 42), Notch3 (SEC ID NO: 43), o Notch4 (SEC ID N°: 44). Los anticuerpos que reconocen los receptores Notch específicos, así como los anticuerpos que reconocen diferentes combinaciones de los cuatro receptores Notch se identifican usando análisis por FACS de células HEK 293 transfectadas con cada receptor Notch como se describe en detalle anteriormente. Se contemplan anticuerpos que reconocen la cuarta repetición de EGF de dos miembros de la familia de receptores Notch (por ejemplo los 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 contemplan los 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 contemplan 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).

Una descripción de la producción y caracterización de ejemplo de un anticuerpo monoclonal, 13M57, que se une EGF4 de Notch1 se puede encontrar en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2008/0131434.

Ejemplo 22

Ensayo Adicionales de Expresión Génica en Células Tumorales Tratadas con 59R1

Se identificaron cambios en la expresión génica en respuesta al tratamiento con 59R1 en células tumorales en modelos de xenoinjerto.

Se identificaron (Tabla 9) varios conjuntos de rutas/genes que se regulan por el anticuerpo 59R1 en células tumorales usando el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (Mootha et al., 2003, Nature Genetics 34:267-73; Subramanian et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 102:15545-50) en los tumores de mama en T1, PE13, y B51. De manera notable, las rutas de los genes del ciclo celular, los genes de activación de Myc y varios conjuntos de genes de células madre se reducen en expresión por 59R1 en este análisis. Se ha mostrado que cMyc es un objetivo directo de la ruta Notch (Weng et al., 2006, Genes Dev. 20:2096-109). Los conjuntos de células madre reducidos en expresión por 59R1 se derivaron de una signatura molecular derivada de cinco poblaciones distintas: células madre hematopoyéticas fetales humanas (HCS), HSC adultas y fetales murinas, células madre neurales (NSC) y células madre embrionarias (ESC) (Ivanova et al., 2002, Science 298:601-604), y también un conjunto recién descrito de genes de ESC de núcleo (Ben-Porath et al., 2008, Nature Genetics 40:499-507) y un conjunto de genes de auto-renovación de ESC cuya reducción de expresión provoca diferenciación (Hu et al., 2009, Genes Dev. 23:837-48).

Tabla 9

Nombre	Tamaño	FDR	Descripción
NGUYEN KERATO UP NOTCH	27	0,0774	Genes concomitantemente modulados por Notch1 activado en queratinocitos primarios activos de humano y ratón

Nombre	Tamaño	FDR	Descripción
CELLCYCLEPATHWAY	22	0,0798	Ciclinas interactúan con cinasas dependientes de ciclina para formar complejos activos de cinasa que regulan el progreso thr
YU CMYC UP	28	0,0884	Genes activados por Myc
HSC STHSC FETAL	27	0,0885	Favorecido en expresión en células madre hematopoyéticas funcionales de corto plazo de ratón de hígado fetal (ST-HSC Compartido)
HSC STHSC SHARED	27	0,0907	Favorecido en expresión en células madre hematopoyéticas funcionales de corto plazo de ratón de médula ósea de adulto
WEINBERG ESC EXP2	30	0,1001	40 genes sobreexpresados específicamente en células hES de acuerdo al meta-análisis de 8 estudios de perfilado (Natu)
ESC SELF RENEWAL	30	0,1087	Genes identificados por un examen de RNAi a lo ancho del genoma, cuya reducción de expresión provocó diferenciación de mESC
BRENTANI REPAIR	33	0,1122	Genes relacionados a cáncer comprendidos en la reparación de ADN
FDR <15%			

Ejemplo 23

Reducción de frecuencia de células madre de cáncer por anticuerpos de Notch2/3

5

Usando un estudio experimental similar como se describe en el Ejemplo 8, un análisis de la frecuencia de células madre de cáncer por análisis de dilución limitante se llevó a cabo en células de cáncer de mama PE13. Se trataron animales que tienen tumores de mama PE13 con el anticuerpo de control, con taxol más anticuerpo de control, 59R1, o taxol más 59R1 durante tres semanas. Los tumores se recolectaron después de tres semanas, y se analizó la frecuencia de CSC en tumores tratados. Titulaciones en serie de células humanas de cada uno de los cuatro grupos de tratamiento se trasplantaron en un nuevo conjunto de ratones (n =10 por dosis de células). Se usó la velocidad de crecimiento tumoral después de 75 días de crecimiento (Figura 19A) para calcular la frecuencia de CSC usando el programa L-calc (Stem Cell Technologies, Inc.). Se determinó que los tumores tratados con el anticuerpo de control tienen una frecuencia celular de inicio tumoral de 1:74. El tratamiento con taxol solo incrementó la frecuencia de CSC a 1:30. En contraste, el tratamiento con 59R1 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:179 y la combinación de 59R1 más taxol disminuyó la frecuencia de CSC a 1:319 (Figura 19B). Un asterisco individual indica una diferencia estadísticamente significativa (p < 0,05) versus el grupo tratado con el anticuerpo de control y un doble asterisco indica una diferencia significativa versus el grupo tratado con taxol y anticuerpo de control. Este experimento indica que el tratamiento con 59R1 de tumores de mama PE13 redujo la frecuencia de CSC como un agente individual y de manera más dramática, en combinación con el tratamiento con taxol. En contraste, el tratamiento con taxol los, en tanto que es efectivo en reducir el volumen tumoral, incrementó la frecuencia de CSC de tumores tratados indicando que las células iniciadoras de tumor son preferencialmente resistentes a los efectos de este agente quimioterapéutico.

10

15

20

25

30

35

Además de investigar los efectos de 59R1 en tumores y el efecto en la frecuencia de CSC, se estudiaron los cambios génicos después del tratamiento con 59R1 en combinación con taxol. El experimento se realizó en tumores de mama PE13 donde se ha observado anteriormente (y descrito en la presente) una disminución en la frecuencia de CSC después del tratamiento con 59R1 solo o tratamiento de 59R1 más taxol. Se realizó un análisis de microarreglo en tumores del mismo experimento donde se llevaron a cabo análisis de dilución limitante de PE13 para la cuantificación de CSC (Figura 19). Se trataron animales que tienen tumores de mama PE13 tres semanas con 59R1 más taxol, control y taxol antes de la recolección para el análisis de microarreglo. Se calcularon valores de expresión diferencial media para los animales tratados con taxol versus control y tratados con 59R1 más taxol versus taxol (3 animales por grupo). Sorprendentemente, en los datos del microarreglo de expresión génica, se encontró que 59R1 en combinación con taxol afectó la apoptosis, hipoxia, diferenciación, y genes relacionados a células madre en la dirección opuesta de aumento que los cambios génicos observados después de taxol solo (Tabla 10) consistente con los efectos de estos compuestos en la frecuencia de CSC.

Tabla 10

Taxol vs. Control		59R1 Taxol vs. Taxol		Símbolo	Nombre
Veces	pval	Veces	pval		
10,2	6,8E-03	-4,3	2,3E-01	BMPR1B	Receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IB
-2,1	4,2E-05	1,8	6,9E-05	BNIP3	Proteína 3 interactuante de 19 kDa de BCL2/adenovirus E1B
-21,2	1,0E-02	11,9	3,9E-04	EGLN3	Homólogo 3 egl nueve

13,4	5,9E-05	-1,8	1,2E-01	HSPB6	Proteína de choque térmico, relacionada a alfa-cristalina, B6
2,2	1,5E-02	-2,5	1,9E-03	ITGAM	Integrina, alfa M
4,6	3,6E-03	-4,4	5,2E-03	LHX8	LIM homecuadro 8
-9,0	2,0E-06	6,4	1,8E-05	NDRG1	Gen 1 regulado en expresión de N-myc
6,4	6,9E-06	-2,2	7,4E-03	RARRES1	Respondedor 1 de receptor de ácido retinoico bajo
2,6	3,5E-04	-1,7	1,1E-03	RARRES1	Respondedor 3 de receptor de ácido retinoico bajo
4,8	3,9E-05	-2,2	1,6E-02	RBP2	Proteína 2 de unión a retinol, celular
10,6	1,3E-10	-1,5	5,9E-02	XAF1	Factor 1 asociado a XIAP

Los genes relacionados a apoptosis en este conjunto de datos incluyen BNIP3, NDRG1 HSPB6, y XAF1. BNIP3 (proteína interactuante de 19 kDa de Bcl-2/E1B) es un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2 que se expresa en regiones hipóxicas de tumores (Kothari *et al.*, 2003, *Oncogene* 22:4734-44). BNIP3 se reducen en expresión por taxol solo y se favorece en expresión por la terapia de combinación, sugiriendo que 59R1 más taxol puede promover la apoptosis. Consistente con esta idea es la observación que HSPB6 se reduce en expresión en tumores tratados con taxol; la sobreexpresión de HSPB6 puede proteger contra apoptosis en algunos sistemas biológicos (Fanet *et al.*, 2005, *Trends Cardiovasc. Med.* 15:138-41). NDRG1 (gen 1 regulado en expresión de N-myc), que se favorece en expresión en el tratamiento de combinación, es necesario para la apoptosis dependiente de p53 (Stein *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279:48930-40). De manera interesante, NDRG1 también es un supresor putativo de metástasis de cáncer colorrectal. Su expresión incrementada se asocia con supervivencia mejorada en cáncer de próstata y mama (Shah *et al.*, 2005, *Clin. Cancer Res.* 11:3296-302). Adicionalmente, NDRG1 está comprendido en la promoción de la diferenciación. Se ha mostrado que la expresión de NDRG1 es altamente expresado en células de cáncer pancreático bien diferenciadas, y no se expresa en las células tumorales menos diferenciadas (Angst *et al.*, 2006, *Br. J. Cancer* 95:307-13). También se observó que otros genes relacionados a células madre tal como BMPR1B y el gen que contiene el homeocuadro, LHX8, se favorecieron en expresión por taxol solo, y entonces se redujeron en expresión con tratamiento con 59R1 en combinación con taxol.

Varios genes comprendidos en el metabolismo de los retinoides (RARRES1, RARRES3, RBP2), que con funcionalmente similares al marcador putativo de células madre ALDH1a1, se favorecieron en expresión por taxol, y luego se redujeron en expresión con el tratamiento con taxol más 59R1. Se ha mostrado que la señalización de ácido retinoico está enlazada a diferenciación celular (Appel y Eisen, 2003, *Neuron* 40:461-4). Tomados conjuntamente, estos datos muestran que 59R1 tiene efectos significativos en expresión génica en células de tumor de mama PE13 y pueden empezar a aclarar algunos de los mecanismos que fundamentan la disminución observada en la frecuencia de células madre de cáncer en ese tumor después de tratamiento con la terapia de combinación de 59R1 y taxol.

En otra modalidad, se usó un modelo de tumor pancreático PN4 para probar la reducción en la frecuencia de células madre de cáncer después del tratamiento con 59R1. Se trataron tumores pancreáticos PN4 con el anticuerpo de control, 59R1 anti-Notch2/3, gemcitabina, o una combinación de 59R1 y gemcitabina durante un período de tres semanas. Los anticuerpos se dosificaron a 10 mg/kg, dos veces por semana y se dosificó gemcitabina a 50 mg/kg, dos veces por semana. Los tumores de cada grupo se recolectaron y procesaron para obtener suspensiones celulares individuales. Las células tumorales humanas en el xenoinjerto se aislaron y contaron. Una titulación de células (30, 90 o 210 células) se re-inyectaron en ratones NOD-SCID (n=10 por grupo). El crecimiento tumoral se evaluó en el día 84 y se calculó la frecuencia de células iniciadoras de tumor de las velocidades de captación tumoral. Se determinó que los tumores tratados con el anticuerpo de control tienen una frecuencia de células iniciadoras de tumor de 1:137. El tratamiento con gemcitabina sola incrementó la frecuencia de CSC a 1:61. En contraste, el tratamiento con 59R1 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:281 y la combinación de 59R1 más gemcitabina disminuyó la frecuencia de CSC a 1:675 (Figura 19C). Un asterisco individual indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) contra el grupo tratado con el anticuerpo de control y un doble asterisco indica una diferencia significativa versus el grupo tratado con gemcitabina y el anticuerpo de control.

En otra modalidad, se usó un modelo de tumor de mama PE13 para probar la reducción en la frecuencia de células madre de cáncer después del tratamiento con 59R5. Se trataron tumores de mama PE13 con el anticuerpo de control, 59R5 anti-Notch2/3, taxol, o una combinación de 59R5 y taxol durante un período de tres semanas. Los anticuerpos se dosificaron a 20 mg/kg, una vez por semana, y el taxol se dosificó a 15 mg/kg, dos veces por semana. Los tumores de cada grupo se recolectaron y procesaron para obtener suspensiones celulares individuales. Las células tumorales humanas en el xenoinjerto se aislaron y contaron. Una titulación de células (50, 150 o 450 células) se re-inyectó en ratones NOD-SCID (n=10 por grupo). Se valoró el crecimiento tumoral en el día 39 y se calculó la frecuencia de células iniciadoras de tumor de la proporción de captación tumoral. Se determinó que los tumores tratados con el anticuerpo de control tienen una frecuencia de células iniciadoras de tumor de 1:70. El tratamiento con taxol solo incrementó la frecuencia de CSC a 1:30. En contraste, el tratamiento con 59R5 disminuyó la frecuencia de CSC a 1:202 y la combinación de 59R5 más taxol disminuyó la frecuencia de CSC a 1:382 (Figura 19D). Un asterisco individual indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) versus el grupo tratado con el anticuerpo de control y un doble asterisco indica una diferencia significativa versus el grupo tratado con taxol y el anticuerpo de control.

Como se observa en otros experimentos, estos resultados indicaron que el tratamiento con 59R1 de tumores pancreáticos PN4 y el tratamiento con 59R5 de tumores de mama PE13, redujo la frecuencia de CSC como un agente individual u más dramáticamente, en combinación con el tratamiento con gemcitabina o taxol, respectivamente. En contraste, el tratamiento con taxol o gemcitabina solos, en tanto que es efectivo en reducir el volumen tumoral, incrementó la frecuencia de CSC de tumores tratados indicando que las células iniciadoras de tumor son preferencialmente resistentes a los efectos de estos agentes quimioterapéuticos.

Secuencias

10 Secuencias de anticuerpo humano anti-Notch2/3

SEC ID N°: 1: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de IgG2 59R1 anti-Notch2/3, más secuencia de señal. La secuencia que codifica para la secuencia de señal está subrayada.

15 ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAG
 GTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGC
 TGC GCGGCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCAAGCCCCT
 GGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTATGCG
 20 GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACATTTACAGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTG
 CAAATGAACAGCCTGCGTGC GGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGTATTTTT
 TTTGCTATTTGGGGCCAAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCAGCACAAAAGGGCCCT
 AGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCCTGGGC
 TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTG
 ACCAGCGGCGTGCACACCTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
 25 AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
 CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGC
 CCACCGTGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC
 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAGTGCGTGGTGGTGACGTGAGC
 CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 30 AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACC
 GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC
 CTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 35 GAGAACAACATAAGACACACCTCCCCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCTCTAC
 AGCAAGCTACCGTGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCATGCTCCGTG
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA
 TGA

40 SEC ID N°: 16: Secuencia prevista de proteína de cadena pesada de IgG2 59R1 anti-Notch2/3, más secuencia de señal. La secuencia de señal está subrayada.

45 MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGS
 NTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTIVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
 ESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT
 VERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTFRWSVLTWHDWLNKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50 SEC ID N°: 3: Secuencia de nucleótidos que codifica para cadena ligera de 59R1 anti-Notch2/3, más secuencia de señal. La secuencia que codifica para la secuencia de señal está subrayada.

55 ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGG
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
 CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCTTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
 CCAGGTCAAGCACCGGCTATTAATTTATGGTGTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
 GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATAGCAGCCTGGAA
 CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC
 CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
 60 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

65 SEC ID N°: 18: Secuencia prevista de proteína de de cadena ligera 59R1 anti-Notch2/3, más secuencia de señal. La

secuencia de señal está subrayada.

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG
 VPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLN
 5 NFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N°: 5: CDR1 de Cadena pesada de 59R1

10 SSSGMS

SEC ID N°: 6: CDR2 de Cadena pesada de 59R1

VIASSGSNTYYADSVKQ

15

SEC ID N°: 7: CDR3 de Cadena pesada de 59R1

GIFFAI

20 SEC ID N°: 8: CDR1 de Cadena ligera de 59R1

RASQSVRSNYLA

SEC ID N°: 9: CDR2 de Cadena ligera de 59R1

25

GASSRAT

SEC ID N°: 10: CDR3 de Cadena ligera de 59R1

30 QQYSNFP

SEC ID N°: 11: Cadena ligera VL de 59R1 de Fab de 59R1 más secuencia de señal. La secuencia de señal está subrayada.

35 MKKTAIAlAVALAGFATVAQADIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG
 VPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEC ID N°: 12: Cadena pesada VH de 59R1 de Fab de 59R1 más secuencia de señal. La secuencia de señal está subrayada.

40

MKQSTIALALLPLFTPVTKAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGS
 NTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 13: Cadena ligera VL de 59R1 de anticuerpo de IgG 59R1

45

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTD
 FTLTISSELEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEC ID N°: 14: Cadena pesada VH de 59R1 de anticuerpo IgG 59R1

50

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
 RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 39: Cadena ligera VL de 59R1 más secuencia de señal mamífera (subrayada)

55

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK
 PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG QGTKVEIKR

SEC ID N°: 40: Cadena pesada VH de 59R1 más secuencia de señal mamífera (subrayada)

60

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
 GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF FAIWGQGLTVTVSSA

65 SEC ID N°: 15: Secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada de anticuerpo IgG2 59RGV anti-
 Notch2/3 (variante de línea germinal de 59R1), más secuencia de señal. La secuencia que codifica para la
 secuencia de señal está subrayada.

ATGAAGCACCTGTGGTCTTTCTGCTGCTGGTCGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCGAG
 GTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC
 TGCGCTGCCTCCGGCTTACCTTCTCCTCCTCCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCTCCC
 5 GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCAGCGGCTCCAACACCTACTACGCC
 GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTG
 CAGATGAACCTCCCTGCCGGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCGCCAGGGGCATCTC
 TTCGCCATCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCTCCGCTCCACCAAGGGCCT
 TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
 10 TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTG
 ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
 TCCGTGGTGACAGTGCCTTCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGAC
 CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGTGCTGCGTGGAGTGC
 CCTCCTTGCCTCCCTCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCT
 15 AAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
 CACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
 AAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
 GTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC[^]GGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGGC
 CTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAG
 20 GTGTACACCCTGCCTCCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
 CTGGTGAAGCGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGAGTGGAGTCCAACGGCCAGCCT
 GAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTAC
 TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAG TAG

25 SEC ID Nº: 2: Secuencia prevista de proteína de la cadena pesada de 59RGV anti-Notch2/3 (variante de línea germinal de 59R1), más secuencia de señal. La secuencia de señal está subrayada.

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGS
 NTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
 30 ESTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDK
 TVERKCCVEGPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 SEC ID Nº: 17: Secuencia de nucleótidos del anticuerpo 59RGV anti-Notch2/3 (variante de línea germinal de 59R1), más secuencia de señal. La secuencia que codifica para la secuencia de señal está subrayada.

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGC
 GAGATCGTGTGCTGACCCAGTCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC
 40 CTGAGCTGCAGGCGGGCTCCAGTCCGTGCGGTCCAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAG
 AAACCCGGACAGGCCCTCGGTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCCGGGCTACCGGCATC
 CTTGCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCTGACCATCTCCTCCCTG
 GAGCCTGAGGACTTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACTCCAACCTCCCTATCACCTTC
 45 GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTC
 CCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC
 TTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAC
 TCCCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACC
 50 CTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC
 CAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAG

SEC ID Nº: 4: Secuencia prevista de proteína de la cadena ligera de anticuerpo 59RGV anti-Notch2/3 (variante de línea germinal de 59R1), más secuencia de señal. La secuencia de señal está subrayada.

MVLQTVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
 GIPARFSGSGSDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLL
 55 NNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

60 SEC ID Nº: 19: Cadena ligera de VL de 59R1 de anticuerpo 59RGV (variante de línea germinal de 59R1)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYIIAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSDFTLTISSE
 LEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

65 SEC ID Nº: 20: Cadena pesada VH de 59R1 de anticuerpo de 59RGV (variante de línea germinal de 59R1)

ES 2 535 614 T3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGLTVTVSSA

SEC ID Nº: 22 (CDR3 de cadena pesada alternativa)

5 SIFYPT

SEC ID Nº: 23 (CDR3 de cadena pesada alternativa)

10 SSFFAS

SEC ID Nº: 24 (CDR3 de cadena pesada alternativa)

15 SSFYAS

SEC ID Nº: 25 (CDR3 de cadena pesada alternativa)

SSFFAT

20 SEC ID Nº: 26 (CDR3 de cadena pesada alternativa)

SIFYPS

SEC ID Nº: 27 (CDR3 de cadena pesada alternativa)

25 SSFFAN

SEC ID Nº: 30 (secuencia de consenso de CDR3 de cadena pesada):

30 (G/S) (I/S) F (F/Y) (A/P) (I/T/S/N)

SEC ID Nº: 47: Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de 59R5 (sin secuencia de señal)

35 GACATCGTGCTGACCCAGTCCCCGCCACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACC
CTGAGCTGTCGGGCTCCCAGTCCGTGCGGTCCAACACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
CCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGGGCTACCGGCGTGCCCT
GCCCCGTTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAG
CCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTCCAACCTTCCCTATCACCTTCGGC
40 CAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCC
CCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTC
TACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
CAGGAGTCCGTACCGGAGCAGGACTCCAAGGACTTACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTG
ACCCTGACAAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
GGCCTGTCTCTCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC

45 SEC ID Nº: 48: Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de 59R5 (sin secuencia de señal)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCTGGGTGCGCCAGGCA
50 CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACCCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCTCCGCCTCCACCAAGGGC
CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTG
55 GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCTTGGCGCC
CTGACCTGTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTG
TCCTCCGTGGTGCACCTTCCCTCAACTTCCGACCCAGACCTACACCTGCAACGCTG
GACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAG
TGCCCTCCTTGTCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAG
60 CCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC
GCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCTGTGCTG
ACCGTGGTGCACCAAGGACTGGTGAACG^CAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAG
GGCCTCCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCTAAGACCAAGGCCAGCCTCGCGAGCCT
65 CAGGTCTACACCCTGCCTCCTAGCCGGGAGTAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAG

ES 2 535 614 T3

CCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTG
TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGC
AAG

5 SEC ID N°: 49: cadena pesada de 59R5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTVTVSSASTKG
10 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVL
TWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
15 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N°: 50: región variable de cadena pesada de 59R5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
20 ADSVKGRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTVTVSSAST

SEC ID N°: 51: CDR3 de cadena pesada de 59R5

SIFYTT

25 SEC ID N°: 52: Región variable de cadena pesada de 59R1 variante

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNK
30 NTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 53: Región variable de cadena pesada de 59R1 variante

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
35 RDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 54: Región Variable de cadena pesada de 59R1 variante

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNK
40 NTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 55: Región variable de cadena pesada de 59R1 variante

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNK
45 NTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 56: Región variable de cadena pesada de 59R1 variante

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTIS
50 RDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 57: Región variable de cadena pesada 59R1 variante

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNK
55 NTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGLTVTVSSA

SEC ID N°: 58: Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada de 59R5 (sin secuencia de señal)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTG
60 TCCTGCGCCGCTTCCGGCTTACCTTCTCCTCCAGCGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCA
CCTGGCAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGTGATCGCCTCCTCCGGCTCCAACACCTACTAC
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACACCTGTAC
CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCCATC
TTCTACACCACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCTCCGCCTCCACC

65 SEC ID N°: 59: Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera de 59R1 (sin secuencia de señal)

GATATCGTGTGACCCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACC
 CTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTCTGTTCTTAATTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAA
 CCAGGTCAAGCACCGCTCTATTAATTTATGGTGTCTTCTCGTGCAACTGGGGTCCCG
 GCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAA
 5 CCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTCTAATTTTCTATTACCTTTGGC
 CAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGT

SEC ID N°: 60: Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada de 59R1 (sin secuencia de señal)

10 CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTG
 AGCTGCGCGGCTCCGATTTACCTTTTCTTCTTCTGGTATGTCTTGGGTGCGCCAAGCC
 CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCGCTTCTTCTGGTAGCAATACCTATTAT
 GCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGGTATT
 15 TTTTTGCTATTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCC

Secuencias relacionadas con Notch humano:

SEC ID N°: 21: Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión Fc de Notch2 (EGF1-12)

20 MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVYHNGTGYCKPEGFLGEYCQHRDPCEKNRCC
 NGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTCHMLSRDYEECTCQVGFTEGKECQWTDAC
 LSHPCANGSTCTVANQFSCKCLTGFTGQKCEDVNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPQGFTGQYCDLSLYV
 PCAPSPCVNGGTCRQTGDFTEFCNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTE
 25 DVDECLLPNACQNGGTCANRNGGYGCVVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLL
 CHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKGY
 AGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELGRADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
 30 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N°: 28 (componente potencial de sitio de unión de 59R1 dentro de EGF10 de Notch2 humano):

HKGAL

35 SEC ID N°: 29 (sitio dentro de EGF9 de Notch3 humano que corresponde al componente potencial de sitio de unión
 de 59R1 dentro de EGF10 de Notch2 humano):

HEDAI

40 SEC ID N°: 45: hNotch1

Aminoácidos 1-1732: Dominio extracelular (subrayado)
 aminoácidos 372-414: repetición 10 de EGF de (doble subrayado y en cursivas)

45 MPPLLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQCQDPNPCLSTPCKNAGTCHV
VDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLADNCLTNPGRNGGTCDLLLTYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPCAN
GGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVNECGQKPLGRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTGPNCEPYPVPCSPSP
CQNGGTCRPTGDVTHEACLPFGFTGQNCENIDDCPGNCKNGGACVDGVNTYNCRCPEWTGQYCTEDVDECO
 50 LMPNACQNGGTCNHTHGGYNCVGVNGWTGEDCSENIIDDCASAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRTGLLACHLN
DACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSQDVDECSLGNPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRC
EIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLCC
YDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHCE
NINECSSQPCRHHGGTCQDRADNYLCFLKGTTPNCEGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLP
 55 YTGATCEWLAPCAPSPCRNGGECRQSEDEYFSCVCPGTGWQGGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTTHGGYRCHC
QAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCDTGINATFCDLPGFRGTFCEDINECASDPCRNGANCTDCVDSYCTC
PAGFSGHICENNTPDCTNESSCFNGGTCVDGDFCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWGLDCAEHVPERL
CPQGYTGPNQNLVHWCDSSPCKNGGKWCWQHTHTQYRCECPSGWTGLYCDVPSVSCEVAARQGVQVAVARLQHG
GLCVDAGNTHHRCQAGYTGSYCEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGYSCKCVAGYHGVNCSSEIDECLSHPCQN
 60 GGTCLDLNPTYKCSPPRGTQGVHCEINVDNCPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFVGERCEGDVN
ECLSNPCDARGTQNCVQRVNDHFCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGAT
CENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPCLCLGPFTEGECQFPASSPCLGGNPNQYNGTCEPTSESPFYRCLCPAKF
NGLLCHDHYFSGGGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNHACGWDDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQC
WKYFSDGHDCSQCNSAGLFDGDFCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWGLDCAEHVPERL
 65 AAGTLWWLMPPEQLRNSFHFLRELSRVLHTNWFKRDAHGQMMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQV
KASLLPGGSEGGRRRRELDPMVVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGLSNIPYKIEAVQSETV

EPPPPAQLHFMYVAAAAFVLLFFVVGCVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASD
GALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEEPWLPDLDQTDHRQWTQQHLDAADLRMSAMAPTPPQGEVDADCMDVNV
RGPDGFPTLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLASADA
NIQDNMGRTPHAAVSADAQGVFQILIRNRATDLARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLKGSAL
5 HWAAAVNNVDAWLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDIAQERMHHDI
VRLLDEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPLCSPNGYLGSLKPGVQGGKVRKPSKGLACGSKEAKDLKARRKKSQD
GKGCLLDSSGMLSPVDSLESPhGYLSDVASPPLLSPFPQQSPSVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAKPEMAALGGG
GRLAFETGPPRLSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLST
10 QAPSLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQVQPQNLMQQQNLQPANIQQQQSLQPPP
PPPQPHLGVSSAASGHLGRSFLSGEPSQADVQLPGSSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAQFLTPPSQHSY
SSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQDQWSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIEAFK

SEC ID N°: 31: Notch2 humano

- 15 Aminoácidos 1-1677: dominio extracelular (subrayado)
Aminoácidos 375-417: repetición 10 de EGF (doble subrayado y en cursivas)

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVYHNGTGYCKCPEGFLGEYCQHRDPCEKNRCQ
20 NGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNNGGTCHMLSRDYEECTCQVGFTEGKECQWTDAC
LSHPCANGSTCTTVANQDFCKLTGFTGQKCEITDVNECDIPGHCCQHGGTCLNLPGSYQCQCQGGFTGQYCDLSLYV
LCHAPCSVNGGTCTCRQTGDFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCENHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWGFQCTE
DVDECLLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVCVNGWSGDCESENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASFSCMCPEGKAGLL
CHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGOYICTCPOGYKADCTEDVDECAMANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKGY
25 AGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHCELEINECQSNPCVNNGQCVDKVNRFQCLCPPGF
TGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNGYECQCATGFTGVLCEENIDNCDPDPCHHGQCQDGDYSYTCICNPGYMG
AICSDQIDECYSSPCLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSGVNCENFDDCASNPCHGICMDGINRYSVCVSPGFTGQR
CNIDIDECASNPCRKGATCINGVNGFRICPEGPHHPSCYSQVNECLSNPCHGICTGGLSGYKCLCDAGWVGINCE
VDKNECLSNPCQNGGTCNDLVNGYRCTCKKGFKGYNCQVNIDECASNPCLNQGTGCFDDISGYTCHCVLPYTGKNC
30 QTVLAPCSPNPCENAAVCKESPNEFESYTCLCAPGWQGRCTIDIDECISKPCMNHGLCHNTQGSYMCECPPGFSGM
DCEEDIDDCLANPCQNGGSCMDGVNTFSLCLPGFTGDKCQTDMECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCCKCQAGFDG
VHCENNINECTESSCFNGGTCVDGINSFSLCPVGFTEGFLHEINECSSHPCLNEGTCVDGLGYRCSPLGYTGK
NCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCDVNVSCDIAASRRGVLVEHLQCHSGVCINAGNTHY
CQ
CPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRCECVPGYQGVNCEYEVDECCNQPCQNGGTCIDLNVHFKC
35 SCPPGTRGLLCEENIDDCARGPHCLNNGQCMDRIGGYSCRCLPGFAGERCEGDINECLSNPCSSEGLDCIQLTND
YLCVCRSAFTGRHCETFDVDCPQMPCLNNGGTCAVASNMPDGFICRCPGFSGARCQSSCGQVKCRKGEQCVTAS
GPRFCFSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSQCAPPFSGSRCELYTAPPSTPPATCLSQYCADKARDG
VCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINNQCDELNTVECLFDNFECQGNSTCKYDKYCAD
HFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIWLMPEQLLDARSFLRALGTLHTNLRIKRDSQGELM
40 VYPYGEKSAAMKQRMTRRSLPGEQEVEAGSKVLEIDNRQCVQSDHCFKNTDAAAALIASHAIQGTLSYPLVS
VVSESLTPERTQLLYLAVAVVILFIILLGVIMAKRKRKHGSLWLPEGFTRRRDASNHKRREPVGQDAVGLKNLSVQVS
EANLIGTGTSEHWVDDEGPQPKKVAEDEALLSEEDPIDRRPWTQQHLEAADIRRTPSIIALTPPQAEQEVDVLDVN
VRGPDGCTPLMLASLRGGSSDLSEDEDAEDSSANIITDLVYQGASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAARLLDA
45 GADANAQDNMGRCPHAAVAADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAAARLAVEGMVAELINCAQADVNAVDDH
GKSALHWAANVNEATLLLLKNGANRDMQDNKEETPLFLAAREGSYEAAKILLDHFANRDITDHMDRLPRDVARDR
MHHDIVRLLDEYNVTPSPPGTVLTSALSPVICGPNRSFSLKHTPMGKKSRRPSAKSTMPSTLPLNAKEAKDAKGSRR
KKSLSEKVQLESSEVTLSPVDSLESPhTYVSDTTSSPMITSPGILQASPNMLATAAPPAPVHAQHLSFNLHEMQP
LAHGASTVLPVSVQLSHHHIVSPGSGSAGLSRLHPVVPADWMNRMEVNETQYNEMFGMVL
50 APAEGTHPGIAPQSRPPEGKHITTPREPLPIVTFQLIPKGSIAQAPAGAPQSTCPPAVAGPLPTMYQIPEMARLPSV
AFPTAMMPQDQVAQTLPAYHPPASVGVKYPPTPSQHSYASSNAERTPSHSHGLQGEHPYLTSPESPQDQWSS
SSPHSASDWSVTTSTPGGAGGGQRGPGTHMSEPPHNMQVYA

SEC ID N°: 32: Notch3 humano

- 55 Aminoácidos 1-1640: Dominio extracelular (subrayado)
Aminoácidos 351-393: repetición 9 de EGF (doble subrayado y en cursivas)

MGPGARRRRRRRRPMSPPPPPPPVRLPLLLLLAGPGAAAPPCLDGSPCANGGRCTQLPSREAACLPPGWVGER
60 CQLEDPCSHSGPCAGRGVCQSSWAGTARFSCRCPRGFRGPDCLPDPCLSSPCAHGARCSVGPDRFLCSCPPGY
QGRSCRSDVDECRVGEPCRHHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCENPAVPCAPSPCRNGGTCRQSGDLTYDCAC
LPGFEGQNCENVDDCPGHRCLNNGTCDVGVNTYNCQCPPEWTGQFCTEDVDECCQLQPNACHNGGTCFNTLGGH
SCVCVNGWTGESCSQNIIDCATAVCFHGATCHDRVASFYCACPMGKTGLLCHLDDACVSNPCHEDAICDTNPVNG
RAICTCPPGFTGGACDQVDDECISGANPCEHLGRCVNTQGSFLCQCGRGYTGPRCETDVNECLSGPCRNOATCLD
65 RIGQFTCICMAGFTGTGYCEVDIDECQSSPCVNGGVCCKDRVNGFSCCTCPSGFSGSTCQLDVDECASRPCRNGAKCVD
QPDGYECRCAEGFEGTLCDRNVDDCSPDPCHHGRCVDGIAFSCACAPGYTGTRCESQVDECRSQPCRHHGKCL
DLVDKYLRCRCPGTTGVNCEVNIDDCASNPCFTGVCRDGINRYDCVCQPGFTGPLCNVEINECASSPCGEGGSCVD

5 GENGFRC LCPPGSLPPLCLPPSHPCAHEPCSHGICYDAPGGFRCVCEPGWSGPRCSQSLARDACESQPCRAGGTC
SSDGMGFHCTCPPGVQGRQCELLSPCTPNPCEHGGRCESAPGQLPVCSCPQGWQGPCRQDQVDECAGPAPCGP
HGICTNLGASFCTCHGGYTGPSCDQDINDCDPNPCLNGGSCQDGVGSFSCSCLPGFAGPRCARDVDECLSNPCG
PGTCTDHVASFTCTCPPGYGGFHCEQDLDCSPSSCFNNGGTCVDGVNSFSCLCRPGYTGAHCQHEADPCLSRPCL
10 HGGVCSAAHPGFRCTCLESFTGPQCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTGAYCLCPPGWSGRLCDIRSLPCREAAAQI
GVRLEQLCQAGGQCVDDESSHYVCPEGRGTGSHCEQEVDPLAQPCQHGGTCRGMGGYMCECLPGYNGDNCE
DDVDECASQPCQHGGSECRSGACHAAHTRDCLQDPGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGGQCRPS
PGPGGGLTFTCHCAQPFWGPCRERVARSCRELQCPVGVPCQQTTPRGPRCACPPGLSGPSCRSFPGSPPGASNAS
CAAAPCLHGGSCRPAFLAPFFRCACAQGWTPRCEAPAAAPEVSEEPRCPRACQAKRGDQRCDRECNSPGCGW
15 DGGDCSLSVGDPWRQCEALQCWRLFNNSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADGRCDQ
GCNTEECGW DGLDGASEVPALiARGVLVLTVLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRDLAHHQAMVFPYHRPSP
GSEPRARRELAPEVIGSWMLEIDNRLCLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFFPYPLRDVRGEPELEPEPSV
PLLPLLAVAGAVLLLVLVGLVMVARRKREHSTLWFPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQDALGMKNMAKGESLMGEV
20 ATLWMDTECEPAKRLKVEEPMGAEAEVDCRQWTQHHLVAADIRVAPAMALTPPQGDADADGMQDVMNVVRGDFT
PLMLASFCGGALEPMPTEEDEADTSASIISDLICGAARTDIRTGETALHLAARYARADAARKRLLDAGADTNAQD
HSGRTPLHTAVTADAQGVFQILIRNRSTDLDARMADGSTALILAAARLAVEGMVEELIASHADVNAVDELGKSALHWAA
AVNNVEATLALLKNGANKMDQDSKEETPLFLAAREGSYEA
KLLLDHFANREITDHLDRLPDVAQERLHQDIVRLDQPSGPRSPPGPHGLGPLLCPGAFPLPGLKAAQSGSKSRRP
PGKAGLGPQGPGRGRKLTACPGPLADSSVTLSPVDSLSPRPFGGPPASPGGFLEGPYAAATATAVSLAQLGG
25 PGRAGLGRQPPGGCVLSLGLLNPAVPLDWARLPPPAPPGPSFLLPLAPGPQLLNPGTPVSPQERPPPYLAVPGHG
EYYPVAGAHSSPPKARFLRVPSEHPYLTPSPESPEHWASPPPSLSDWSESTSPATATGAMATTTGALPAQPLPLS
VPSSLAQAQTQLGPQPEVTPKRQVLA

SEC ID Nº: 46: hNotch4

25 Aminoácidos 1-1444 Dominio extracelular (subrayada)
 Aminoácidos 392-434 repetición 10 de EGF 10 (doble subrayado y en cursivas)

30 MQPPSLLLLLLLLLLLLCVSWRPRGLLCGSFPEPCANGGTCLSLSLGQGTCCQAPGFLGETCQFPDPCQNAQLCQNG
GSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFCRGRCHIQASGRPQCSCMPGWTGEQ
CQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACERDVNECFQDPGCPKGTSCHNLTGFSQCLCPVQGEQ
PRCEL RAGPCPPRGCSNNGT CQLMPEKDFHLCCLGPPGFIGDPCEVNPDCVSHQCQNGGTCQDGLDITYTCLCP
ETWTGWDCSEDVDECETQGPPhCRNNGT CQNSAGSFHCVCVSGWGGTSC EENLD CIAATCAPGSTCIDRVGSF
35 SCLCPPGRGTGLCHLEDMCL SOPCHGDAOCTNPLTGSTLCLCOPGYGGPFCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSC
LNTPGSFNCLCPPGYTGSRCPEADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPPGLEGLCEVETNECASAPCLNHADC
HDLLNGFQCICLPFGSGRCEEDIDECRSSPCANGGCQDQPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCPVGASC
LDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCPKQICKDQKDKANCLCPD GSPGCAPPEDNCTCHHGHCCRSSCVCD
VGWTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCTCPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGGYCT
CPPSHTGPPCQTSTDYCVSAPCFNNGT
40 CVNRPGTFSCLCAMGFQGRCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRLCPTGYTGGSCQTLMDLCAQKPCPR
NSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSGPSYFCHCPPGFQGLCQDH
VNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDQNCSEKELDACQSQPCHNHGTC TPKPGGFHCACPPGFVGLRCE
GDVDECLDQCPHTGTGAACHSLANAFYCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTC EATAGSPLGFICHCPKGF
45 GPTC SHRAPSCGFHHCHHGGLCLPSPKPGFPPRCALQSGYGGPDCLTPPAPKGC GPPSPCLYNGSCSETTGLGGP
GFRCSCPHSSPGPRCQKPGAKGCEGRSGD GACDAGCSGPGGNWDGGDCSLGVPDPWKGCPSHSRCWLLFRDG
QCHPQCDSEELFDGYDCETPPACTPAYDQYCHDFHNGHCEKGCNTAECGWDGDCRPEDGDPEWGPSLALL
WLSPPALDQQLFALARVLSLTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPYPGARAEELGGTRDPTYQERAAPQTQPLGKETDSL
SAGFVW MGVDL SRCGPDHPASRCPWDPGLLLRFLAAMA AVGALEPLLPGLLAVH PHAGTAPPANQLPWPVLCSPV
50 AGVILLALGALLVLQLIRRRRREHGALWLP PGFTRRPRQTQSAPHRRRRPPLGEDSIGL KALKPKAEVDEDGWMCSGPE
EGEEVQAEEETGPPSTCQLWLSGGCGALP
QAAMLTPPQESEMEAPDLDRGPDGVTPLMSAVCCGEVQSGTFQGAWLGCPEPWEPLLDGGACPAHTVGTGET
PLHLAARFSRPTAARRLLEAGANPNQPD RAGRTP LHAAVAADAREVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAV
EDLVEELIAAQADV GARDKWGKTALHWA AAVNNARAARSLLQAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEVAQ LLLGL
55 GAARELRDQAGLAPADVAHQRNHWDLTLLEGAGPPEARHKATPGREAGPFPRARTVSVVPPHGGGALPRCRTL
SAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGGAYSHCRSLSGVGAGGGPTPRGRRFSAGMRGPRPNPAIMRGRYGVA
AGRGRVSTDDWPCDWVALGACGSASNIPIPPCLTPSPERGSPQLDCGPP ALQEMPINQGGEGKK

SEC ID Nº: 33: Secuencia de polinucleótidos que codifica para EGF 1-12 de Notch2 humano

60 ATGCCCGCCCTGCGCCCGCTCTGCTGTGGCGCTGCTGGCGCTCTGGCTGTGCTGCGCG
GCCCCGCGCATGCATTGCAGTGTGAGATGGCTATGAACCCTGTGTAATGAAGGAATG
TGTGTTACCTACCACAATGGCACAGGATACTGCAAATGTCCAGAAGGCTTCTTGGGGGAA
TATTGTCAACATCGAGACCCCTGTGAGAGAACCCTGCCAGAATGGTGGGACTTGTGTG
65 GCCCAGCCATGCTGGGGAAAGCCAGTGCCGATGTGCCTCAGGGTTTACAGGAGAGAC
TGCCAGTACTCAACTCTCATCCATGCTTTGTGTCTCGACCTGCCTGAATGGCGGACA
TGCCATATGCTCAGCCGGGATACCTATGAGTGCACCTGTCAAGTCGGGTTTACAGGTAAG

GAGTGCCAATGGACGGATGCCTGCCTGTCTCATCCCTGTGCAAATGGAAGTACCTGTACC
 ACTGTGGCCAACCAGTTCTCCTGCAAATGCCTCACAGGCTTCACAGGGCAGAAATGTGAG
 ACTGATGTCAATGAGTGTGACATTCCAGGACACTGCCAGCATGGTGGCACCTGCCTCAAC
 CTGCCTGGTTCCTACCAGTGCAGTGCCTCAGGGCTTCACAGGCCAGTACTGTGACAGC
 5 CTGTATGTGCCCTGTGCACCCTCACCTTGTGTCAATGGAGGCACCTGTGCGGCAGACTGGT
 GACTTCACTTTTGTGAGTGCAACTGCCTTCCAGGTTTTGAAGGGAGCACCTGTGAGAGGAAT
 ATTGATGACTGCCCTAACCCACAGGTGTGAGAATGGAGGGGTTTTGTGTGGATGGGGTCAAC
 ACTTACAACCTGCCGCTGTCCCCACAATGGACAGGACAGTTCTGCACAGAGGATGTGGAT
 GAATGCCTGCTGCAGCCC?^TGCCTGTCAAATGGGGGCACCTGTGCCAACC GCAATGGA
 10 GGCTATGGCTGTGTATGTGTCAACGGCTGGAGTGGAGATGACTGCAGTGAGAACATTGAT
 GATTGTGCCTTCGCTCCTGTACTCCAGGCTCCACCTGCATCGACCGTGTGGCCTCCTTC
 TCTTGCATGTGCCAGAGGGGAAGGCAGGTCTCCTGTGTGCATCTGGATGATGCATGCATC
 AGCAATCCTTGCAC^^GGGGGCACTGTGTGACACCAACCCCTAAATGGGCAATATATT
 TGCACTGCTCCCAAGGCTACAAAGGGGCTGACTGCACAGAAGATGTGGATGAATGTGCC
 15 ATGGCCAATAGCAATCCTTGTGAGCATGCAGGAAAATGTGTGAACACGGATGGCGCCTTC
 CACTGTGAGTGTCTGAAGGGTTATGCAGGACCTCGTTGTGAGATGGACATCAATGAGTGC
 CATTAGACCCCTGCCAGAATGATGCTACCTGTCTGGATAAGATTGGAGGCTTCACATGT
 CTGTGCATGCCAGGTTTTCAAAGGTGTGCATTGTGAATTA

20 SEC ID N°: 34: secuencia de polipéptido de EGF 1-12 de Notch2 humano

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVYHNGTGYCKPPEGFLGE
 YCQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGT
 25 CHMLSRDYEECTCQVGFTEGKECQWTDACL SHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCE
 TDVNECDIPGHQCQHGCTCLNLPGSYQCQCPQGFQYCDLSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTG
 DFTFECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWGTGFCTEDVD
 ELLQPNACQNGGTCANRNGGYGCVVNGWSGDDCSENIDDCAFASCTPGSTCIDRVASF
 SCMCPEGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECA
 MANSNPCEHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFCTC
 30 LCMPGFKGVHCEL

SEC ID N°: 35: EGF10 de Notch1 humano

LNDACISNPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSQDVD

35

SEC ID N°: 36: EGF10 de Notch2 humano

LDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVD

40 SEC ID N°: 37: EGF9 de Notch3 humano (EGF9 es el EGF de Notch3 humano que corresponde a EGF10 de los otros receptores Notch incluyendo Notch2)

LDDACVSNPCHEDAICDTNPVNGRAICTCPPGFTGGACDQDVD

45 SEC ID N°: 38: EGF10 de Notch4 humano

LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDL

50 SEC ID N°: 41: repetición 4 de EGF de Notch1

QADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQ

SEC ID N°: 42: repetición 4 de EGF de Notch2

55 TDACLSHPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCE

SEC ID N°: 43: repetición de EGF de Notch3
 SDVDECRVGEPCRHGGTCLNTPGSFRCQCPAGYTGPLCEN

60 SEC ID N°: 44: repetición de EGF de Notch4

RDFCSANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPPGFEGHACER

AUSTRALIA

65 El solicitante notifica por la presente que la aportación de una muestra de un microorganismo se efectuará

solamente antes de la concesión de una patente, o antes de que caduque, se rechace o se retire la solicitud, a una persona que sea un destinatario experto sin interés en la invención (Regulación 3.25(3) de las Regulaciones de Patentes Australianas).

5 **CANADÁ**

El solicitante pide por la presente que, hasta que se haya emitido una patente canadiense basándose en la solicitud o la solicitud se haya rechazado, o se abandone y ya no esté sujeta a restablecimiento, o se retire, la aportación de una muestra de material biológico depositado indicado en la solicitud solo se efectuará a un experto independiente nominado por el Comisario de Patentes.

15 **CROACIA**

El solicitante pide por la presente que una muestra de material biológico depositado indicado en la solicitud deba ponerse a disposición entre la publicación de la solicitud y la concesión de la patente solamente a un experto independiente. Las muestras se pondrán a disposición solamente si la persona que las pide se compromete, durante el periodo en el que la patente esté vigente, a no poner las mismas o cualquier material derivado de ellas a disposición de terceras partes, y a no usar las mismas o cualquier material derivado de ellas excepto para fines experimentales o de investigación, a no ser que el solicitante o titular de la patente, según sea aplicable, renuncie a dicho compromiso.

20 **DINAMARCA**

El solicitante pide por la presente que, hasta que la solicitud se haya abierto a inspección pública (por la Oficina de Patentes Danesa), o la Oficina de Patentes Danesa haya decidido finalmente sobre ella sin abrirse a inspección pública, la aportación de una muestra se efectuará solamente a un experto en la técnica. Cualquier petición realizada por una tercera parte para la aportación de una muestra indicará el experto que se empleará. Ese experto puede ser cualquier persona introducida en una lista de expertos reconocidos elaborada por la Oficina de Patentes Danesa o cualquier persona aprobada por el solicitante en el caso individual.

30 **FINLANDIA**

El solicitante pide por la presente que, hasta la publicación de la mención de la concesión de una patente por la Comisión Nacional de Patentes y Registro de Finlandia o durante 20 años desde la fecha de presentación si la Comisión Nacional de Patentes y Registro de Finlandia ha decidido sobre la solicitud sin dar como resultado la concesión de una patente, la aportación de una muestra se efectuará solamente a un experto en la técnica. Cualquier petición realizada por una tercera parte para la aportación de una muestra indicará el experto que se empleará. Ese experto puede ser cualquier persona introducida en una lista de expertos reconocidos elaborada por la Comisión Nacional de Patentes y Registro de Finlandia o cualquier persona aprobada por el solicitante en el caso individual.

40 **ALEMANIA**

El solicitante pide por la presente que, hasta la concesión de una patente o durante 20 años desde la fecha de presentación si la solicitud se rechaza o se retira, solamente se expedirá una muestra a un experto independiente nominado por el solicitante.

45 **ISLANDIA**

El solicitante pide por la presente que, hasta que se haya concedido una patente o se haya tomado una decisión por la Oficina de Patentes Islandesa con respecto a una solicitud que no ha dado como resultado una patente, la aportación de una muestra se efectuara solamente a un experto en la técnica. Cualquier petición realizada por una tercera parte para la aportación de una muestra indicará el experto que se empleará. Ese experto puede ser cualquier persona introducida en una lista de expertos reconocidos elaborada por la Oficina de Patentes Islandesa o cualquier persona aprobada por el solicitante en el caso individual.

NORUEGA

5 El solicitante pide por la presente que, hasta que la solicitud se haya abierto a inspección pública (por la Oficina de Patentes Noruega), o la Oficina de Patentes Noruega haya decidido finalmente sobre ella sin abrirse a inspección pública, la aportación de una muestra se efectuará solamente a un experto en la técnica. Cualquier petición realizada por una tercera parte para la aportación de una muestra indicará el experto que se empleará. Ese experto puede ser cualquier persona introducida en una lista de expertos reconocidos elaborada por la Oficina de Patentes Noruega o cualquier persona aprobada por el solicitante en el caso individual.

10 **SINGAPUR**

El solicitante pide por la presente que la aportación de una muestra de un microorganismo se ponga solamente a disposición de un experto.

15 **ESPAÑA**

20 El solicitante pide por la presente que, hasta la publicación de la mención de la concesión de una patente española o durante 20 años desde la fecha de presentación si la solicitud se rechaza o se retira, el material biológico se pondrá a disposición como se indica en el Artículo 45 SPL solamente por la expedición de una muestra a un experto independiente.

SUECIA

25 El solicitante pide por la presente que, hasta que la patente se haya concedido por la Oficina de Patentes y Registro Sueca o si se ha decidido sobre la solicitud sin dar como resultado la concesión de la patente, la aportación de una muestra se efectuará solamente a un experto en la materia. Lo mismo se aplica a solicitudes rechazadas o retiradas en un periodo de 20 años desde la fecha de presentación.

SUIZA

30 El solicitante pide por la presente que la aportación de muestras a una tercera parte pueda estar sujeta a la condición de que esa parte indique a la institución depositaria su nombre y dirección para el fin de informar del depositario y se compromete: (a) a no poner a disposición el cultivo depositado o un cultivo derivado de él a una tercera parte; (b) a no usar el cultivo fuera de los límites previstos por la ley; (c) a aportar, en caso de disputa, pruebas de que las obligaciones según los artículos (a) y (b) no se han violado.

LA ANTIGUA REPÚBLICA YUGOSLAVA DE MACEDONIA

40 El solicitante pide por la presente que la aportación de muestras a una tercera parte pueda estar sujeta a la condición de que esa parte: (a) tiene derecho a demandar que se ponga a disposición una muestra del material biológico o microbiológico viable; (b) se ha comprometido a asegurar que el solicitante no autoriza el acceso a la muestra del material biológico o microbiológico viable a ninguna tercera parte antes de la expiración del periodo prescrito de validez de la patente.

45 **REINO UNIDO**

El solicitante pide por la presente que la aportación de una muestra de un microorganismo se ponga solamente a disposición de un experto.

50 **OFICINA DE PATENTES EUROPEA**

55 El solicitante pide por la presente que, hasta la publicación de la mención de la concesión de una patente europea o durante 20 años desde la fecha de presentación si la solicitud se rechaza o se retira, o se considera retirada, el material biológico se pondrá a disposición según lo dispuesto en la Norma 28(3) EPC solamente por la expedición de una muestra a un experto nominado por el solicitante (Norma 28(4) EPC).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une de manera específica a Notch2 y Notch3 humano, que comprende:
 - 5 (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEC ID N°: 5), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKKG (SEC ID N°: 6), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEC ID N°: 51) o SEC ID N°: 30; y
 - 10 (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEC ID N°: 8), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEC ID N°: 9), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEC ID N°: 10).
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la CDR3 de cadena pesada comprende SIFYTT (SEC ID N°: 51).
- 15 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende región variable de cadena pesada SEC ID N°: 50 y región variable de cadena ligera SEC ID N°: 13.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la CDR3 de cadena pesada comprende SIFYPT (SEC ID N°: 22), SSFFAS (SEC ID N°: 23), SSFYAS (SEC ID N°: 24), SSFFAT (SEC ID N°: 25), SIFYPS (SEC ID N°: 26), SSFFAN (SEC ID NO: 27) o GIFFAI (SEC ID N°: 7).
- 20 5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 4, que comprende:
 - 25 (a) una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 20; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 19.
- 30 6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo mono-específico, un anticuerpo IgG1 o un anticuerpo IgG2.
- 35 7. Un anticuerpo codificado por el polinucleótido depositado en la ATCC como PTA-10170 o por el polinucleótido depositado en la ATCC como PTA-9547.
8. Una célula que comprende o que produce el anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 9. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de cáncer.
- 45 11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el tratamiento reduce la tumorigenicidad de un tumor y/o reduce la frecuencia de células madre cancerosas en el tumor.
- 50 12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de pulmón o melanoma.
- 55 13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo a un sujeto, y comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente al sujeto, en donde el segundo agente es un agente antineoplásico y/o un agente antiangiogénico.
14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico.
- 60 15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel, gemcitabina o irinotecan.
- 65 16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el segundo agente es un antagonista del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) o de un receptor de VEGF.

17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el segundo agente es un anticuerpo anti DLL4.

5 18. Uso del anticuerpo como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el tratamiento de cáncer es tratamiento como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17.

Figura 1A

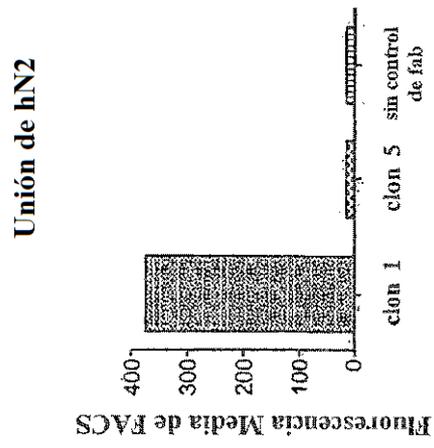


Figura 1B

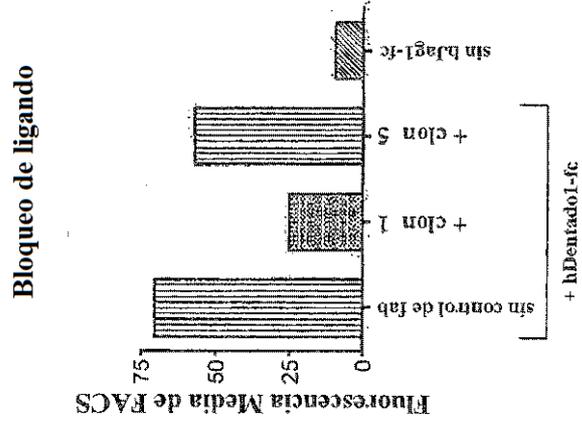


Figura 1D

Unión de hN2

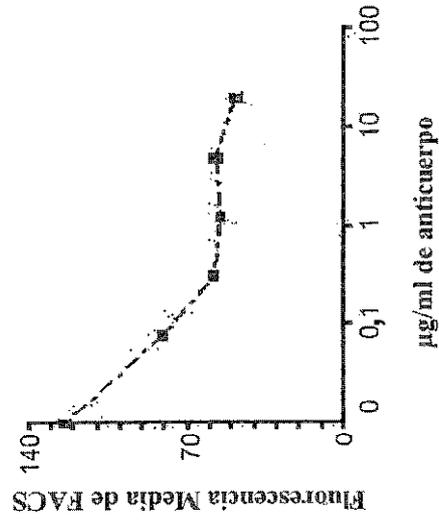


Figura 1C

Unión de hN2

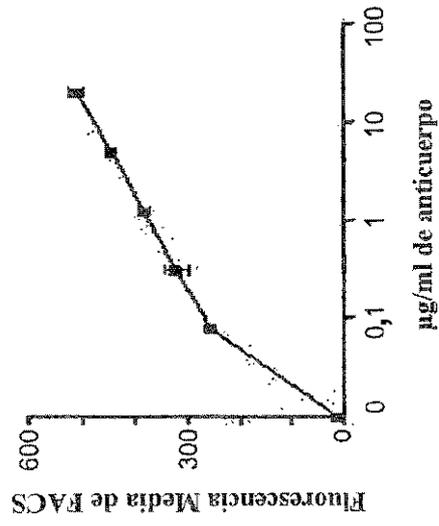


Figura 1E

G	I	F	F	A	I
S	T	Y	Y	S	T
R	S			T	S
	N			P	N

Figura 1F

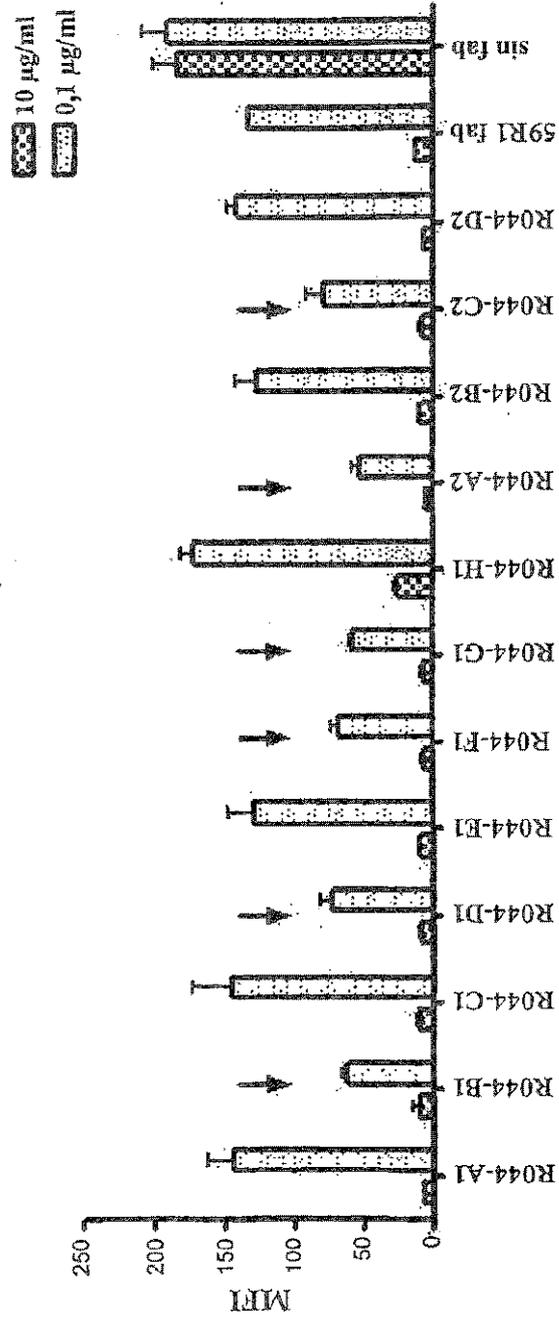


Figura 2

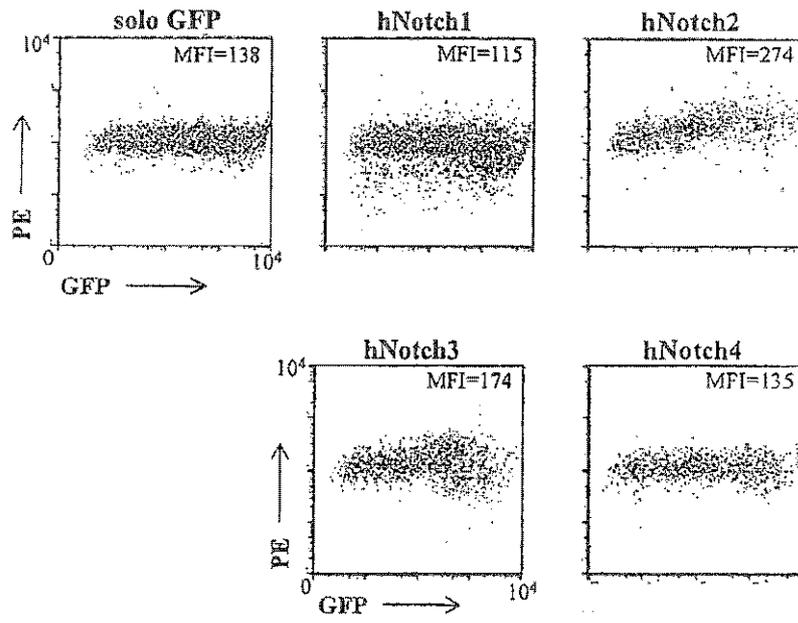


Figura 3A

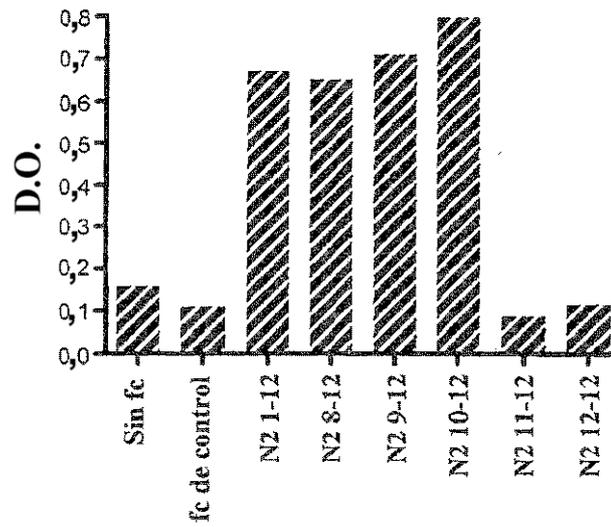
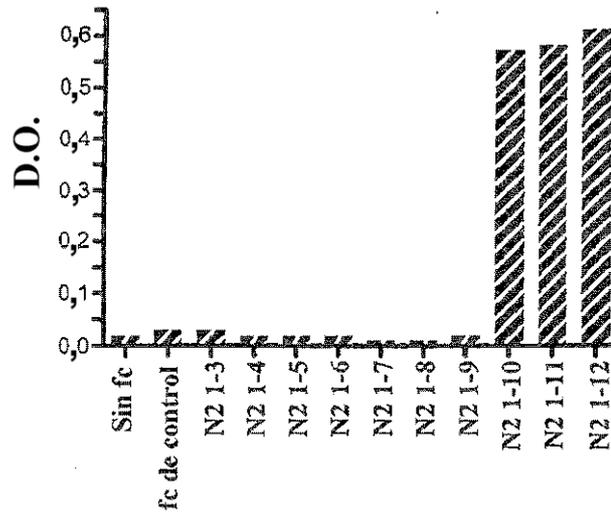


Figura 3B

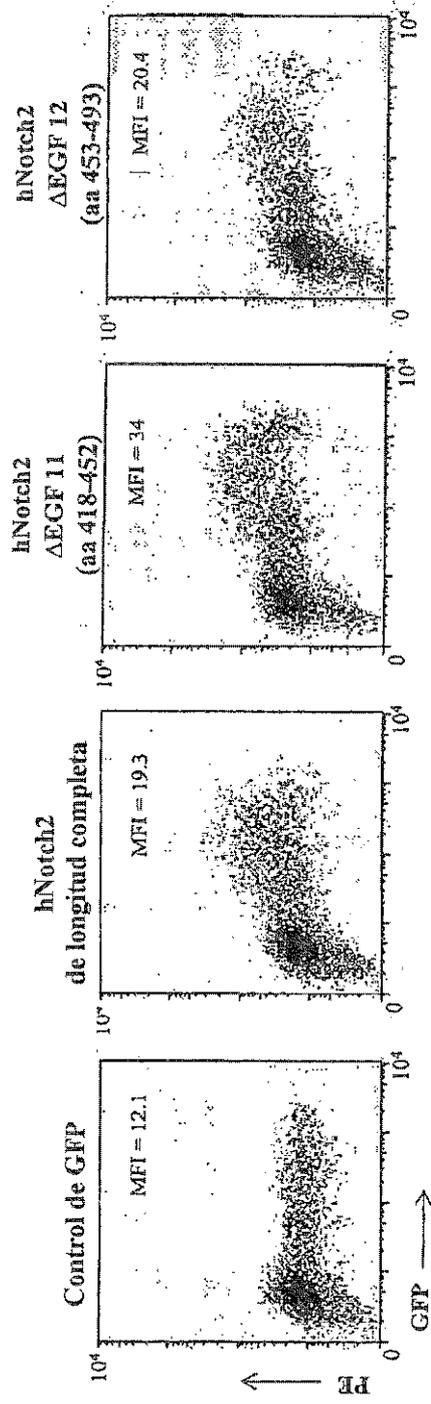


Figura 3C

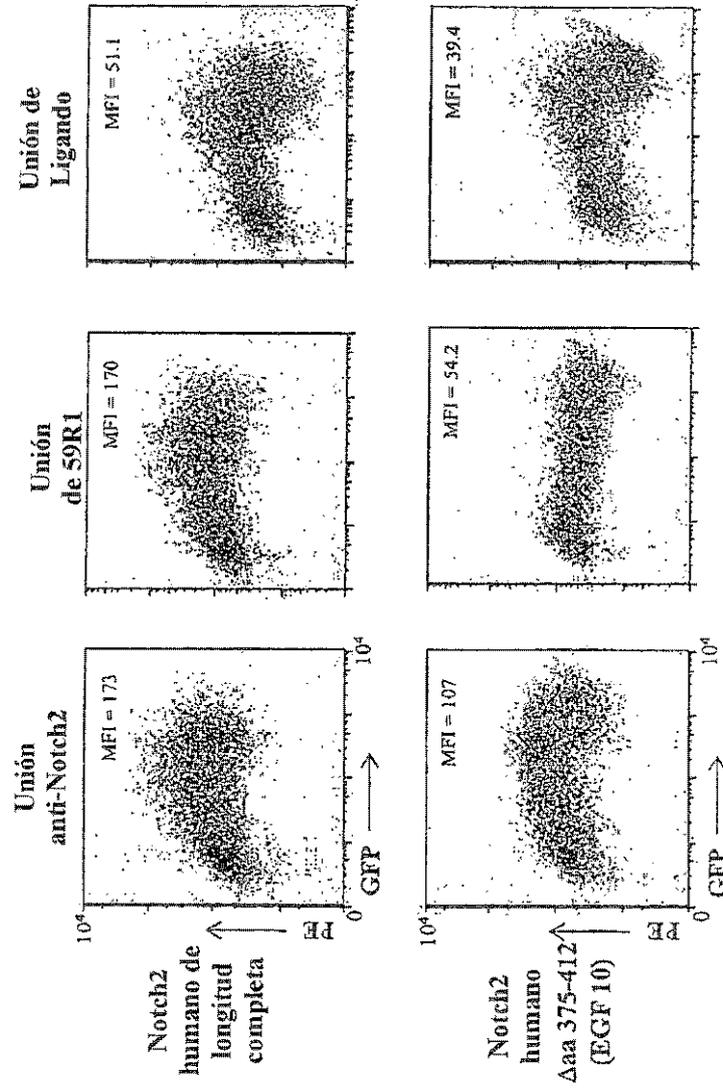


Figura 4A

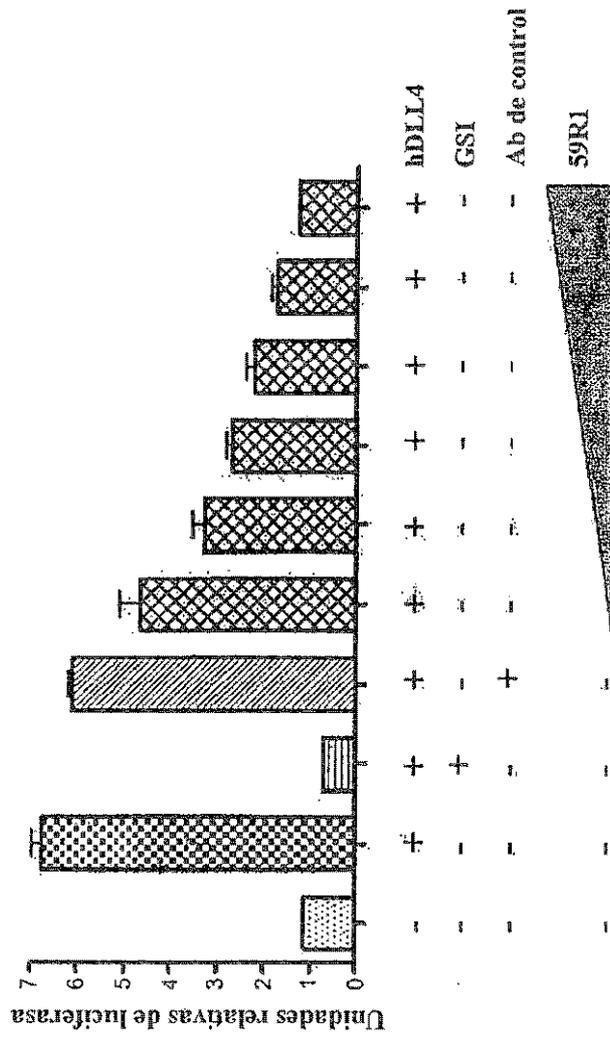


Figura 4B

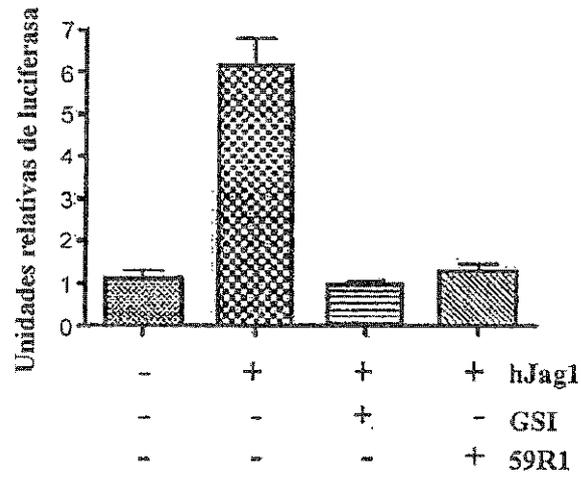


Figura 4C

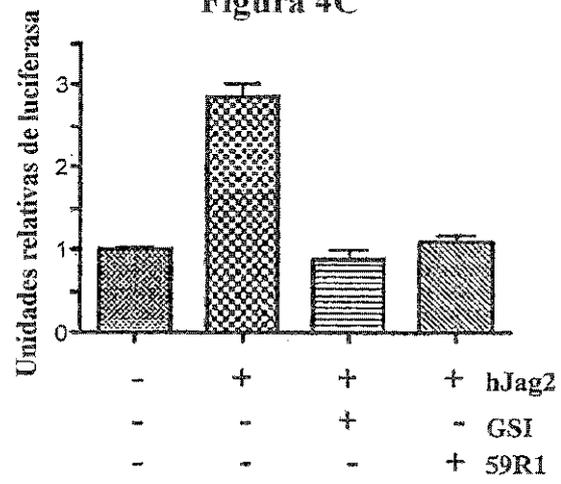


Figura 5A

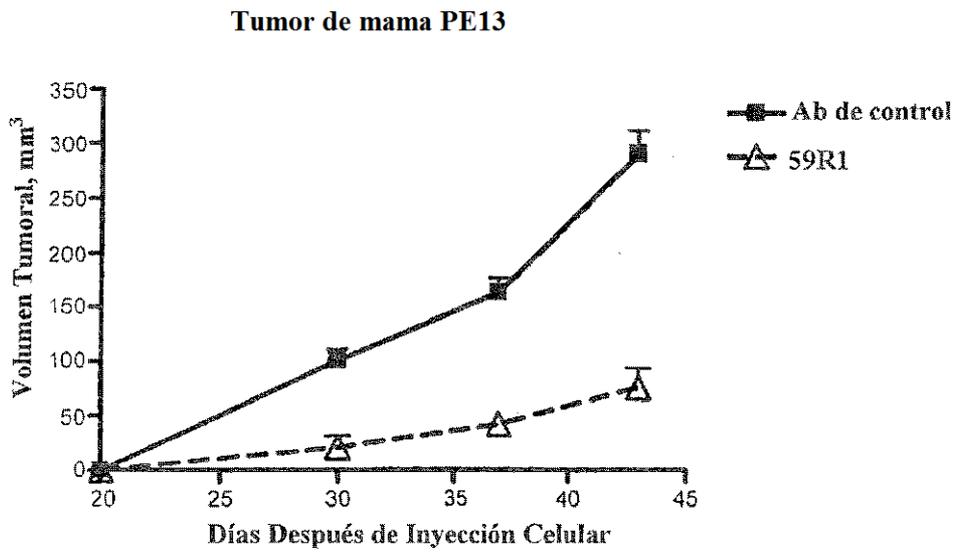


Figura 5B

Tumor de mama T3

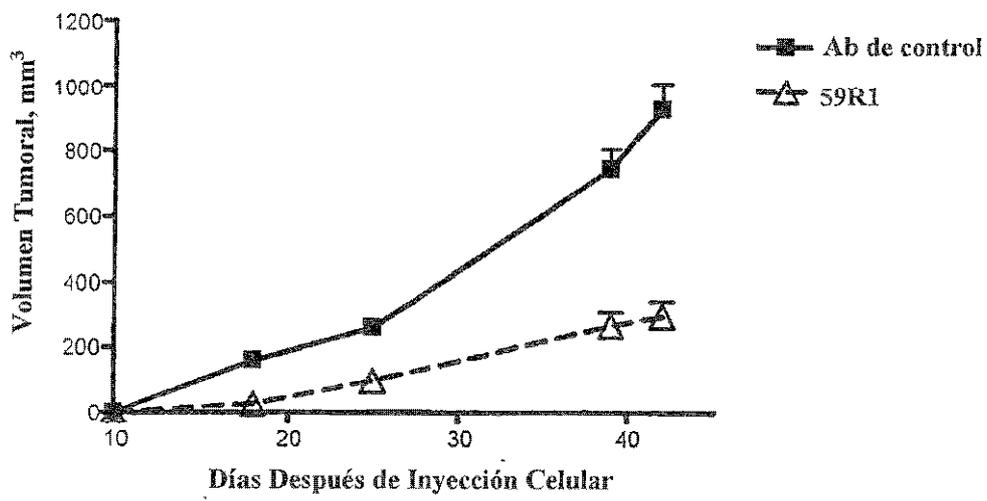
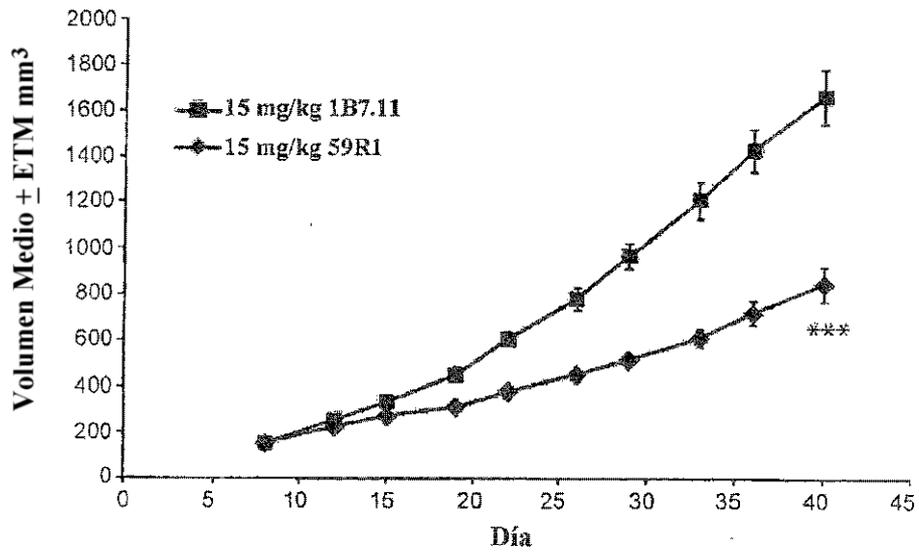


Figura 5C

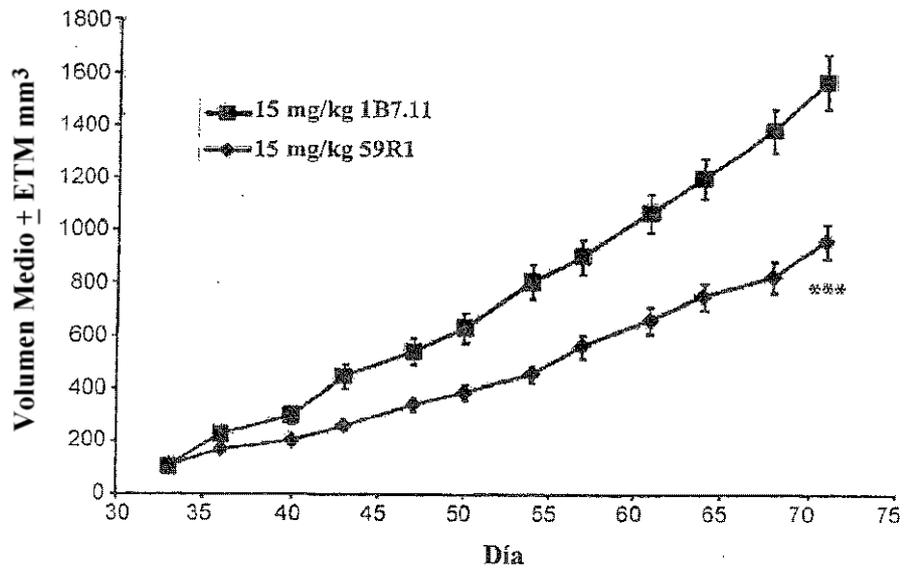
Tumor de colon COLO205



*** p < 0,001, 59R1 con relación a 1B7.11

Figura 5D

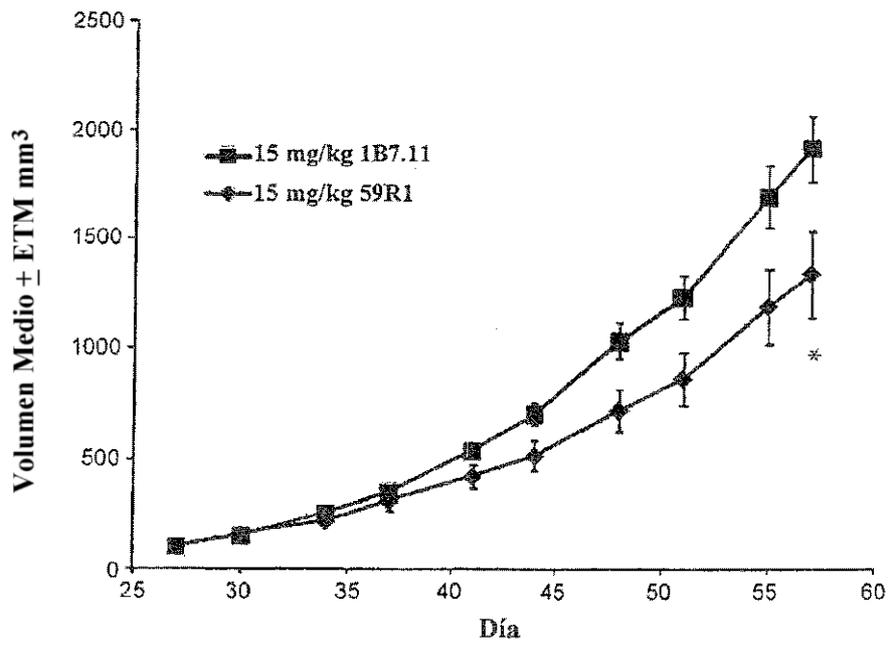
Tumor pancreático PN4



*** p < 0,001, 59R1 con relación a 1B7.11

Figura 5E

Tumor de mama PE13



* p < 0,05, 59R1 con relación a 1B7.11

Figura 5F

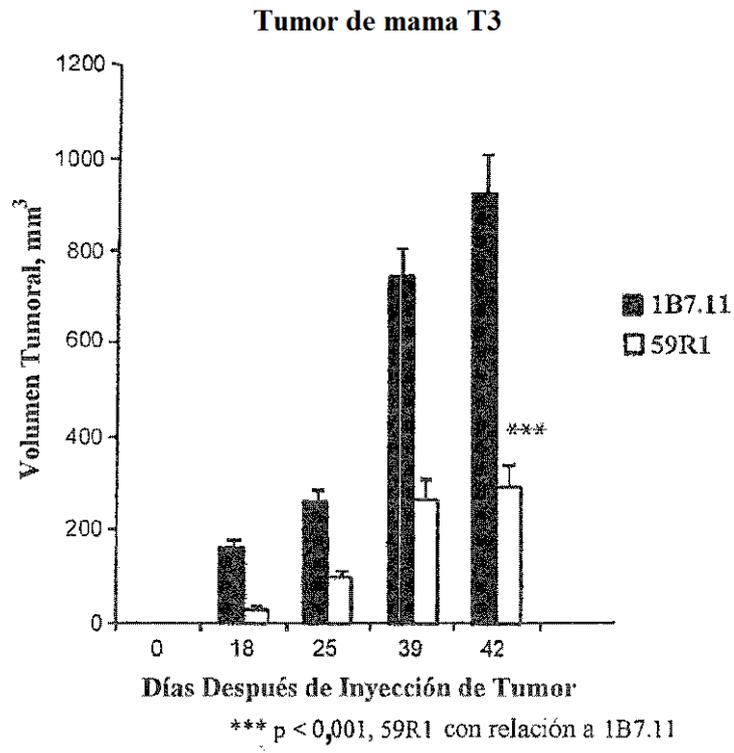


Figura 6

Tumor de mama B51

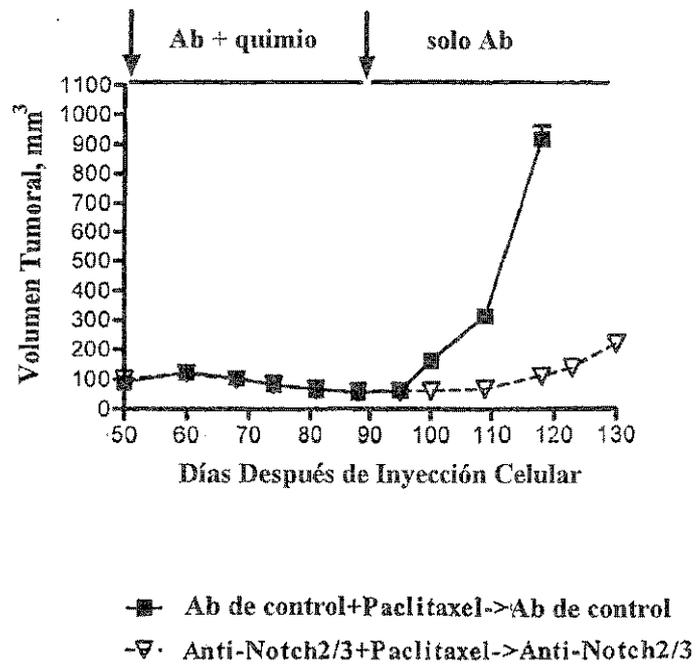


Figura 7

Crecimiento de tumor de mama B51 (día 72)

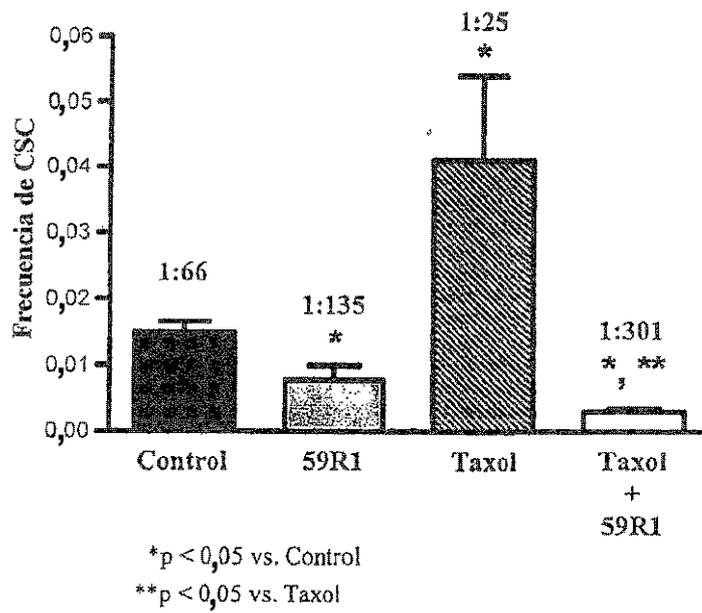
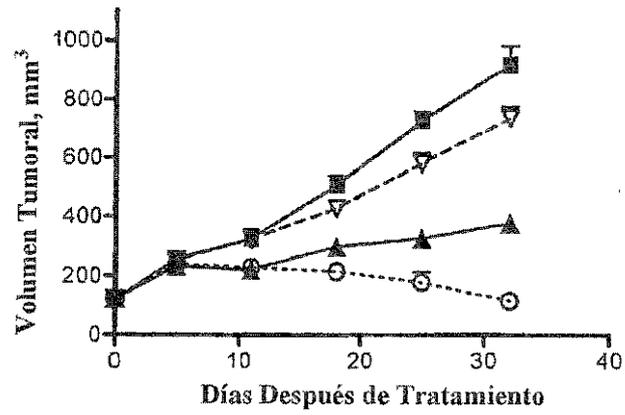


Figura 8

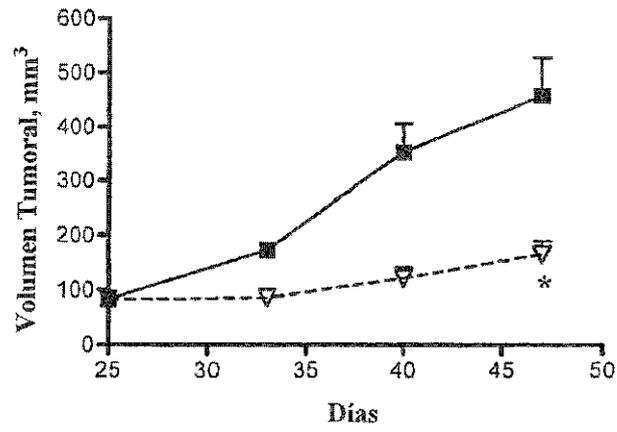
Tumor pancreático PN4



- Ab de control
- ▽ Anti-Notch2/3
- ▲ Gemcitabina
- Anti-Notch2/3+Gem

Figura 9

Melanoma M4



■ Ab de control

▽ Anti-Notch2/3

*p = 0,001 vs. Ab de control

Figura 10

Tumor de colon C28

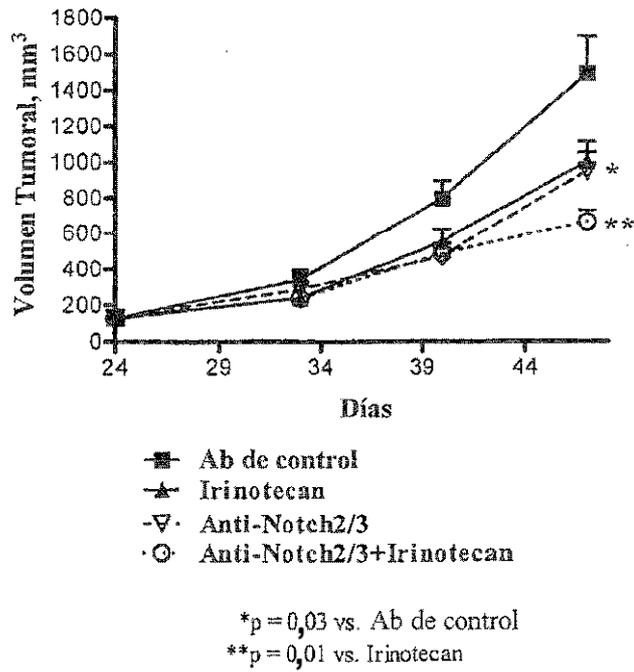


Figura 11A

Tumor de colon COLO205

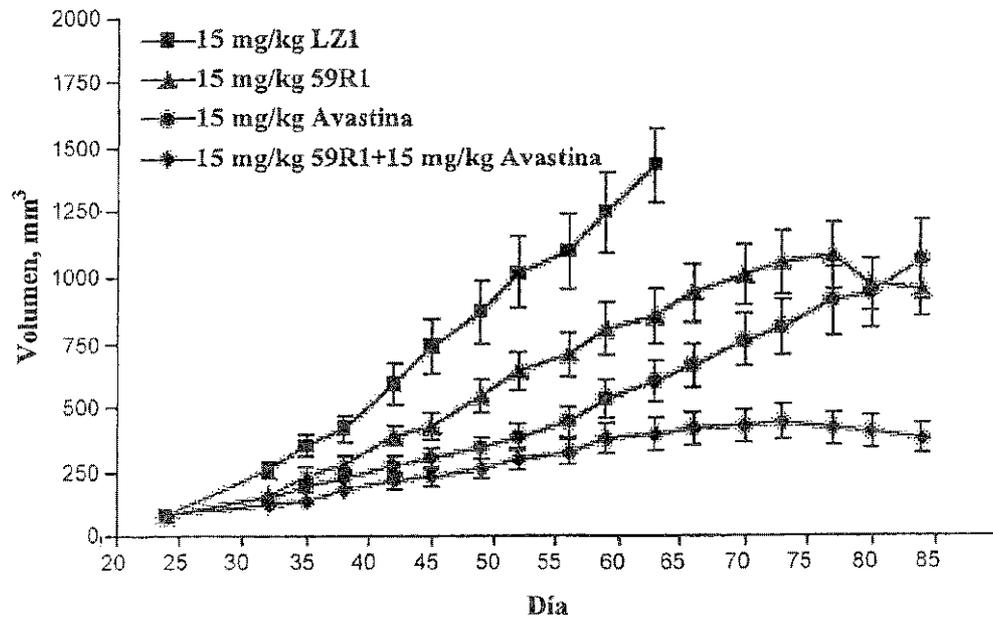


Figura 11B

Tumor de colon C8

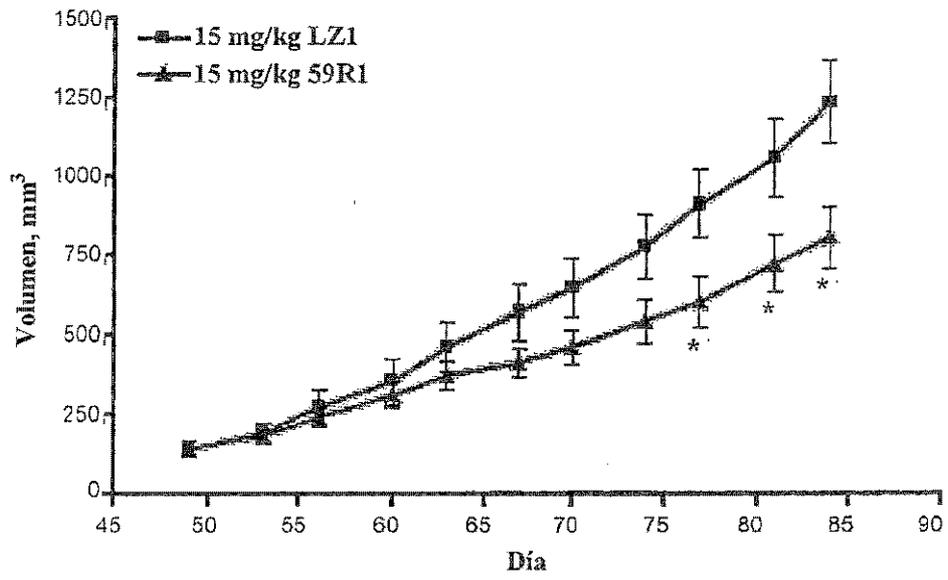


Figura 11C

Tumor pancreático PN8

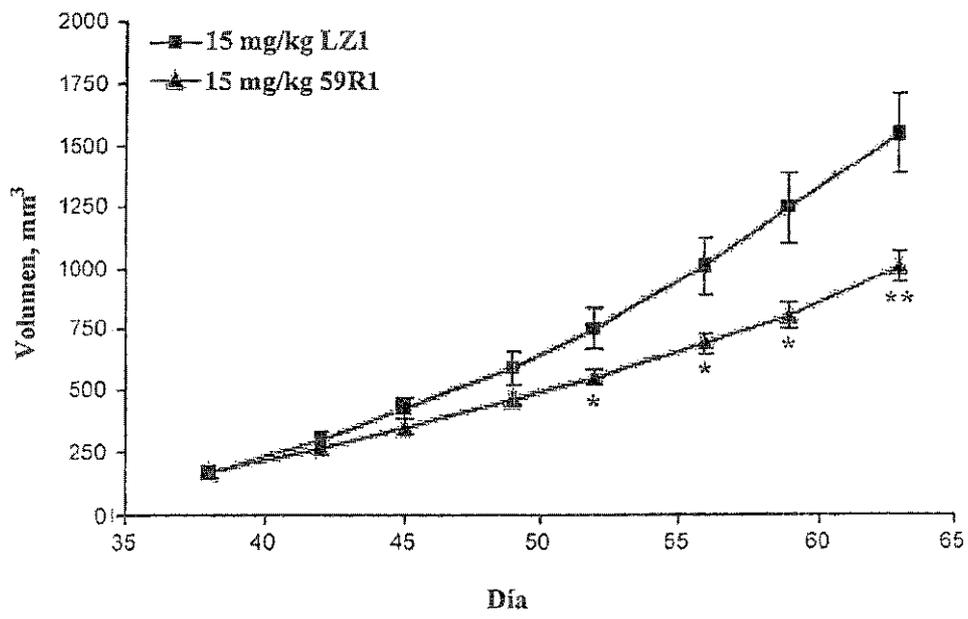


Figura 11D

Tumor de mama B34

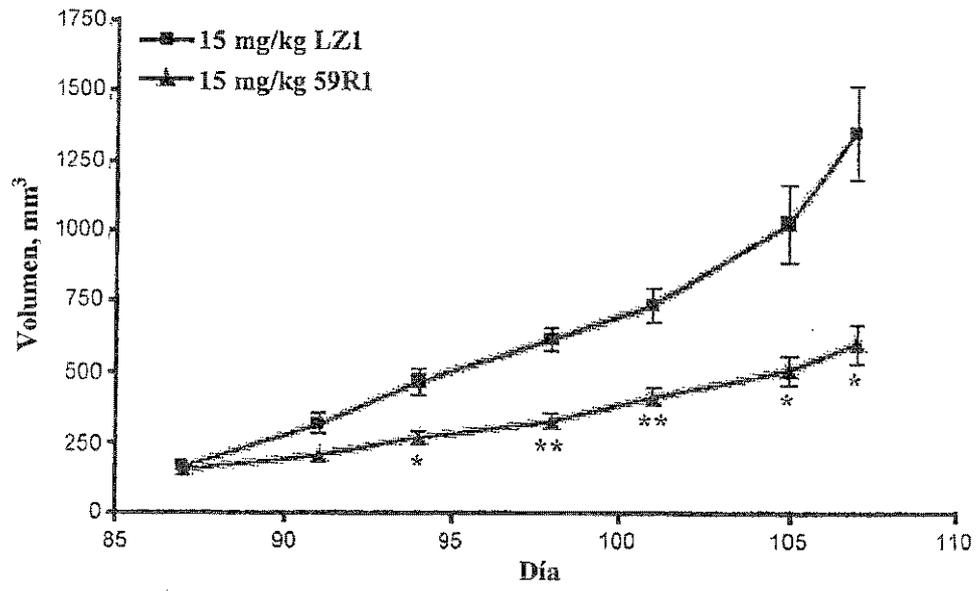


Figura 11E

Tumor de mama B39

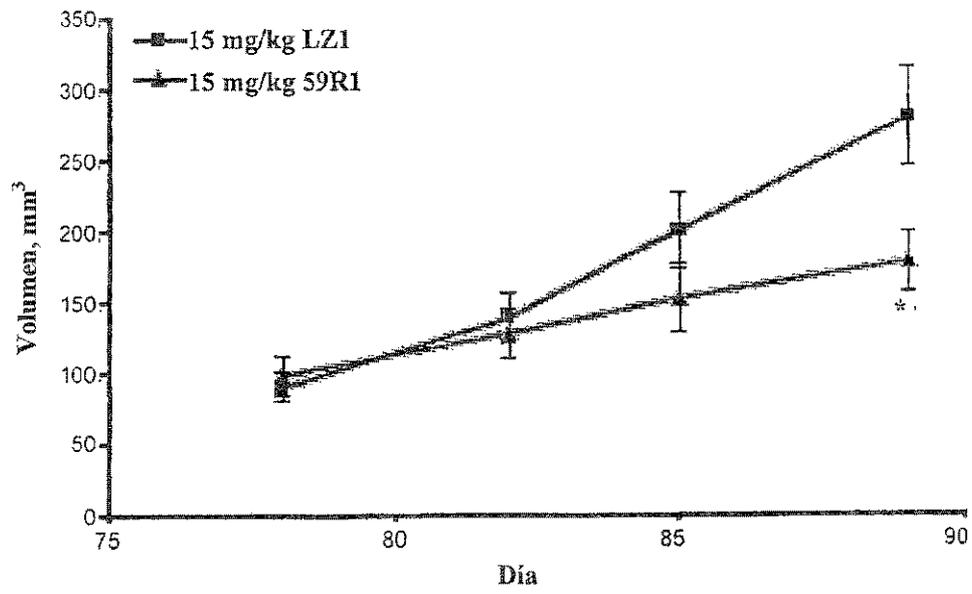


Figura 11F

Tumor de mama B44

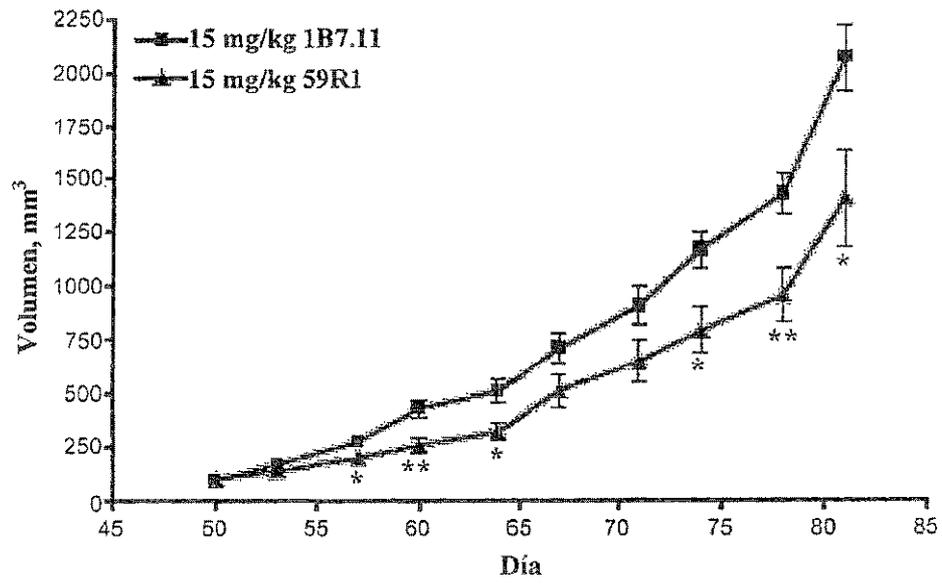


Figura 11G

Tumor de mama PE13

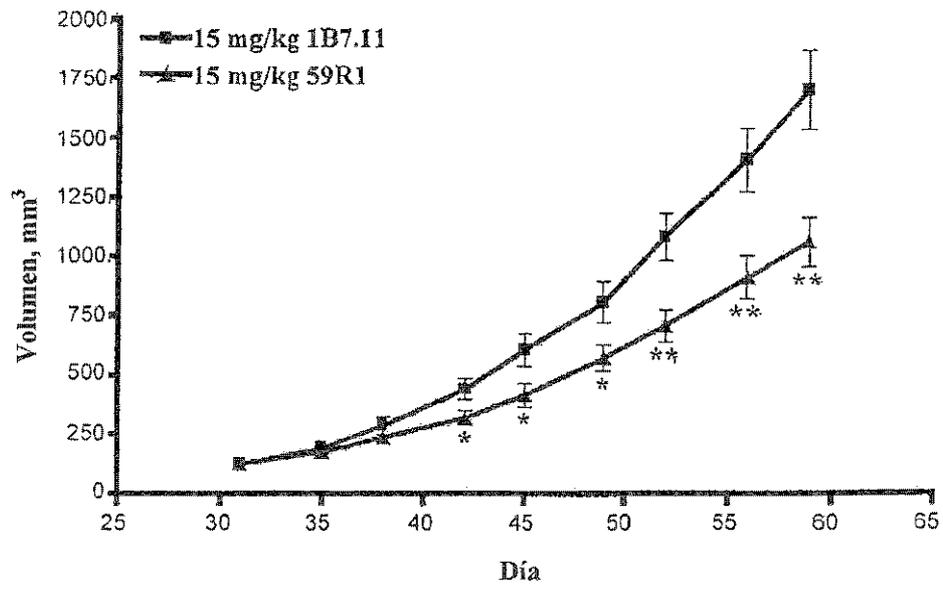


Figura 11H

Tumor de mama T1

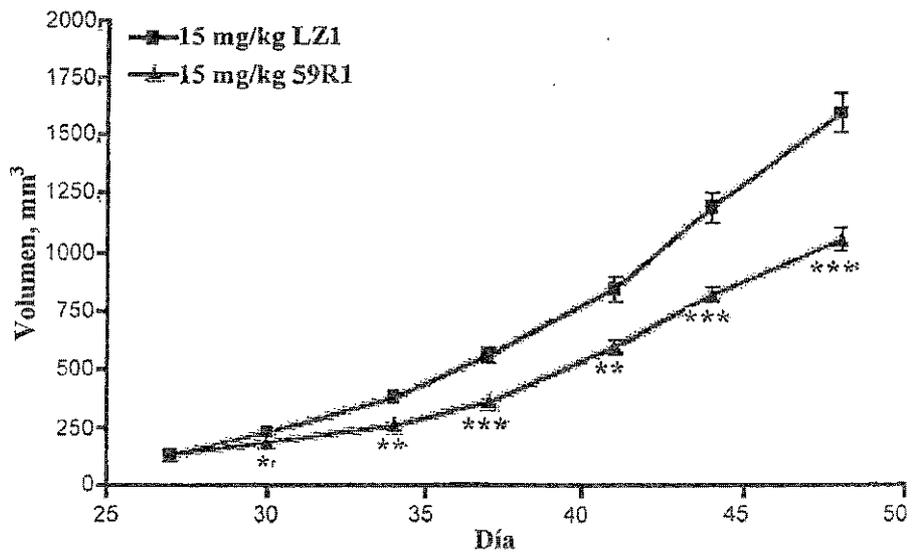


Figura 12A

HEYL

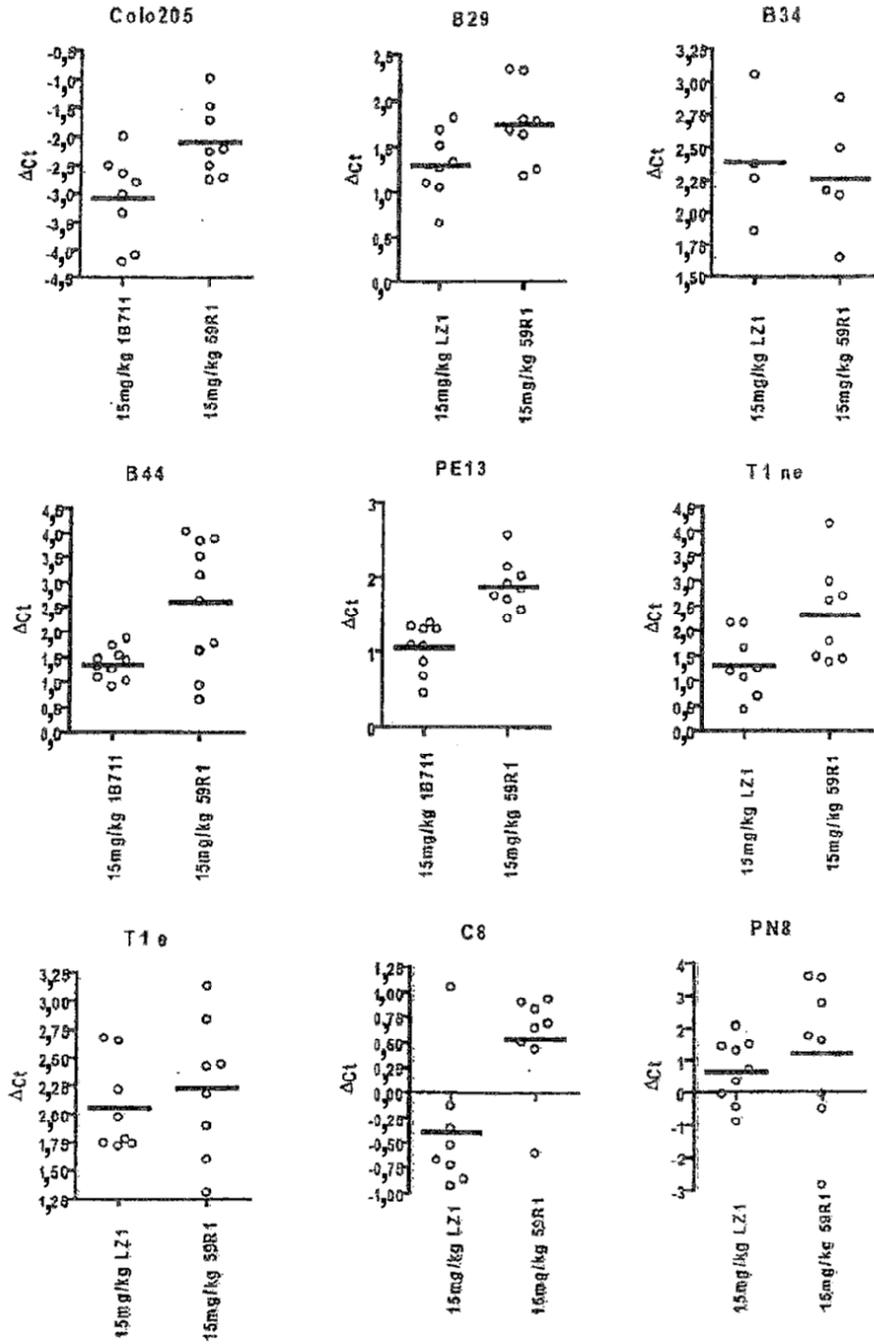


Figura 12B
NOTCH3

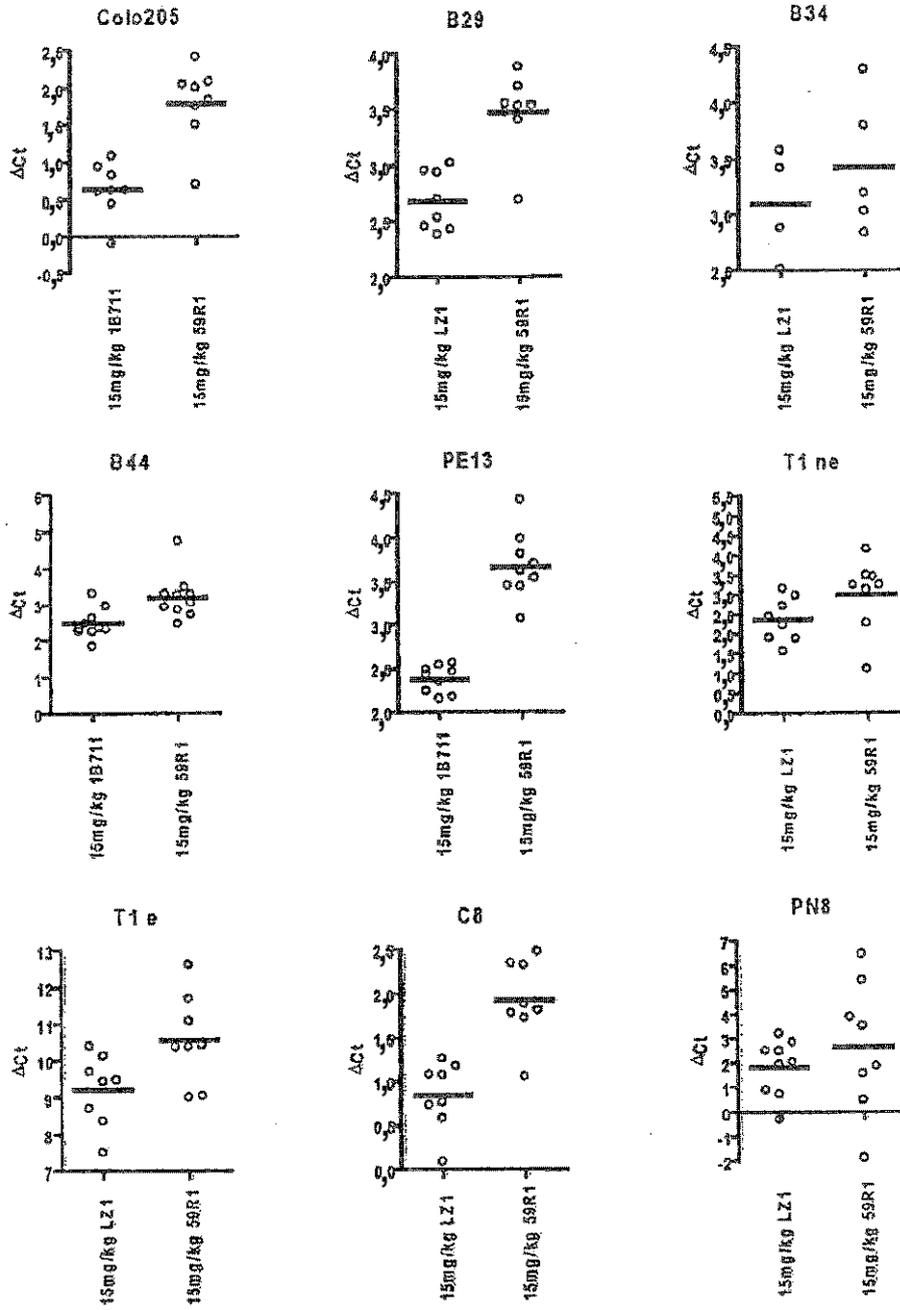


Figura 12C

RGS5

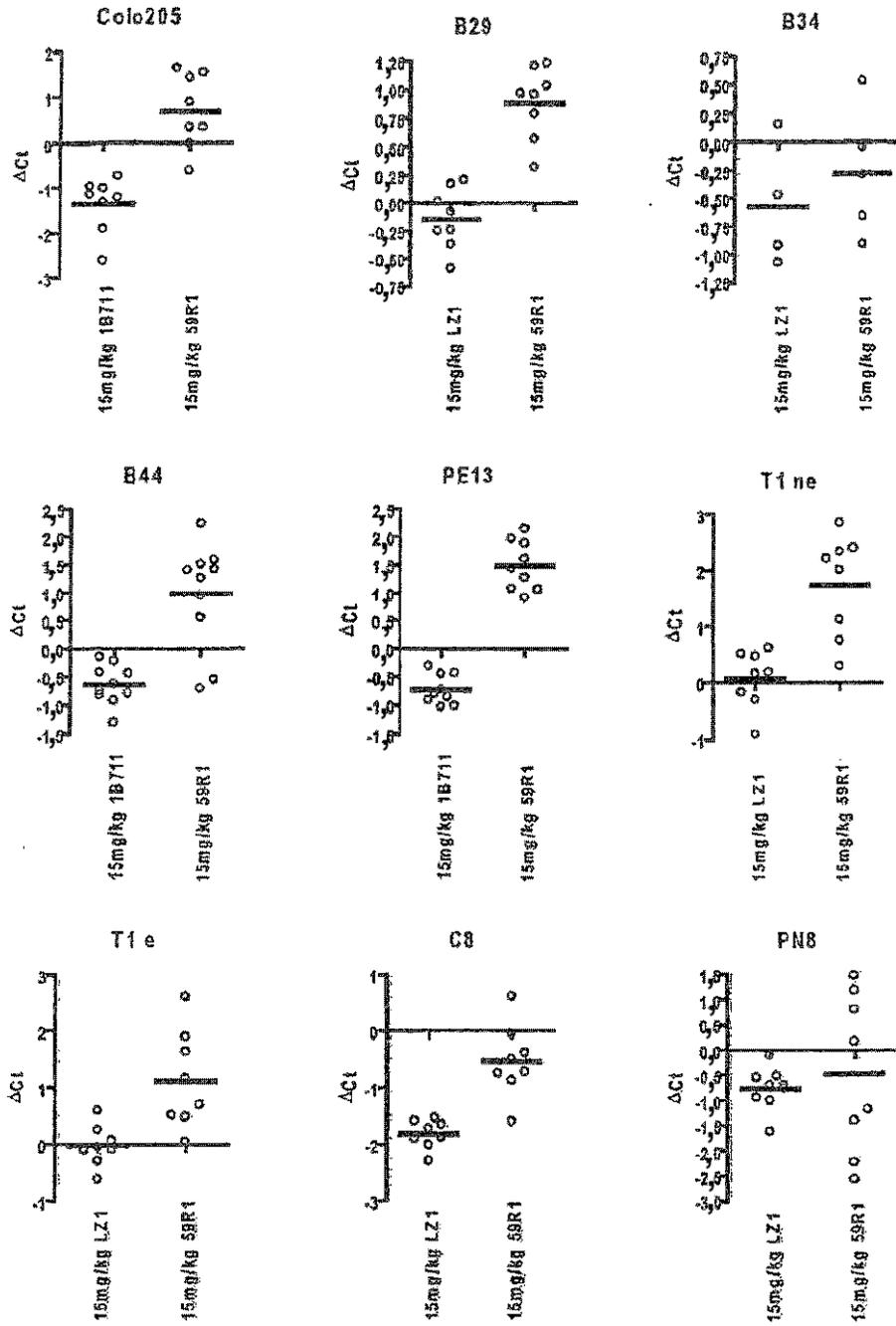


Figura 12D
ANGPT1

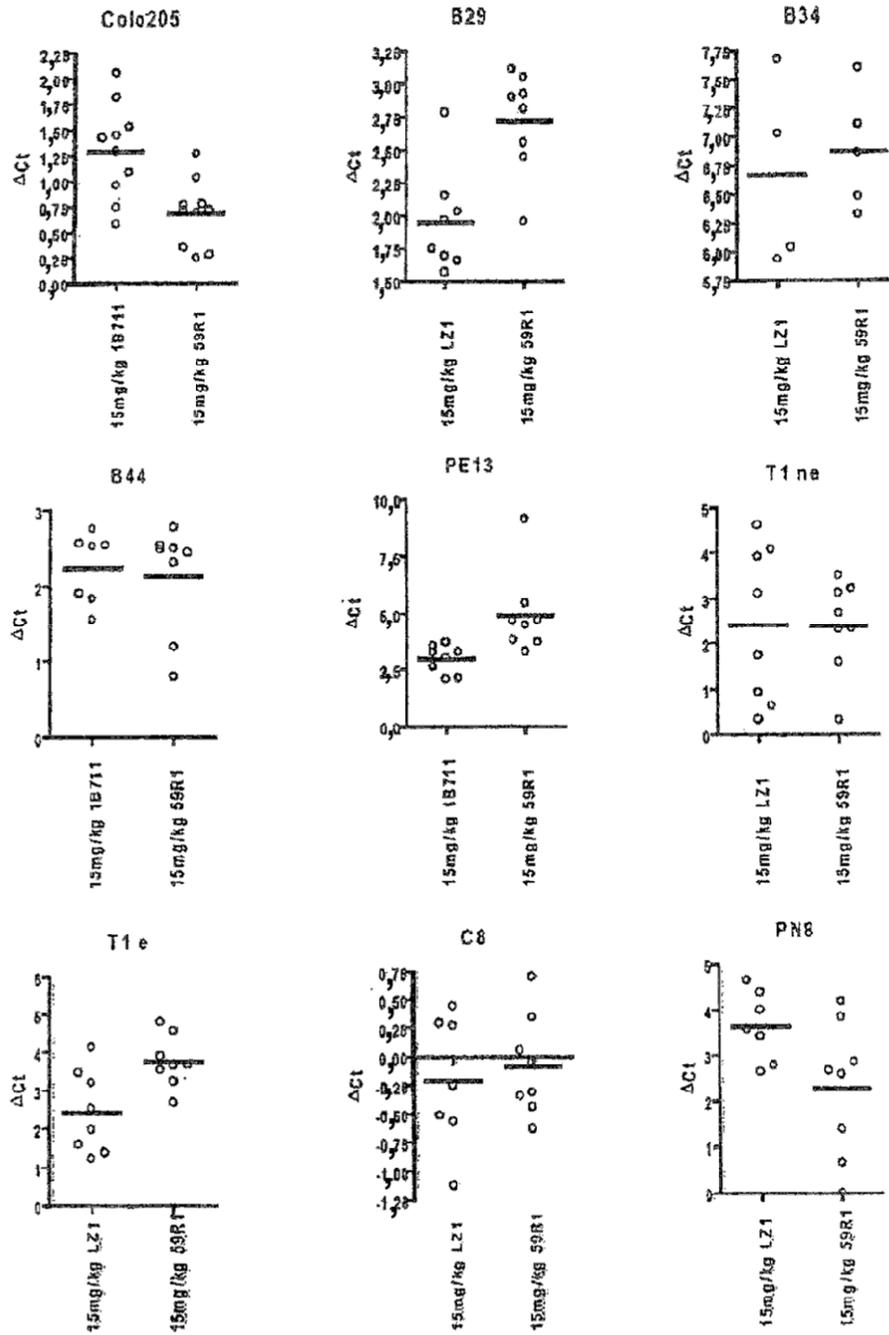


Figura 12E

ANGPT2

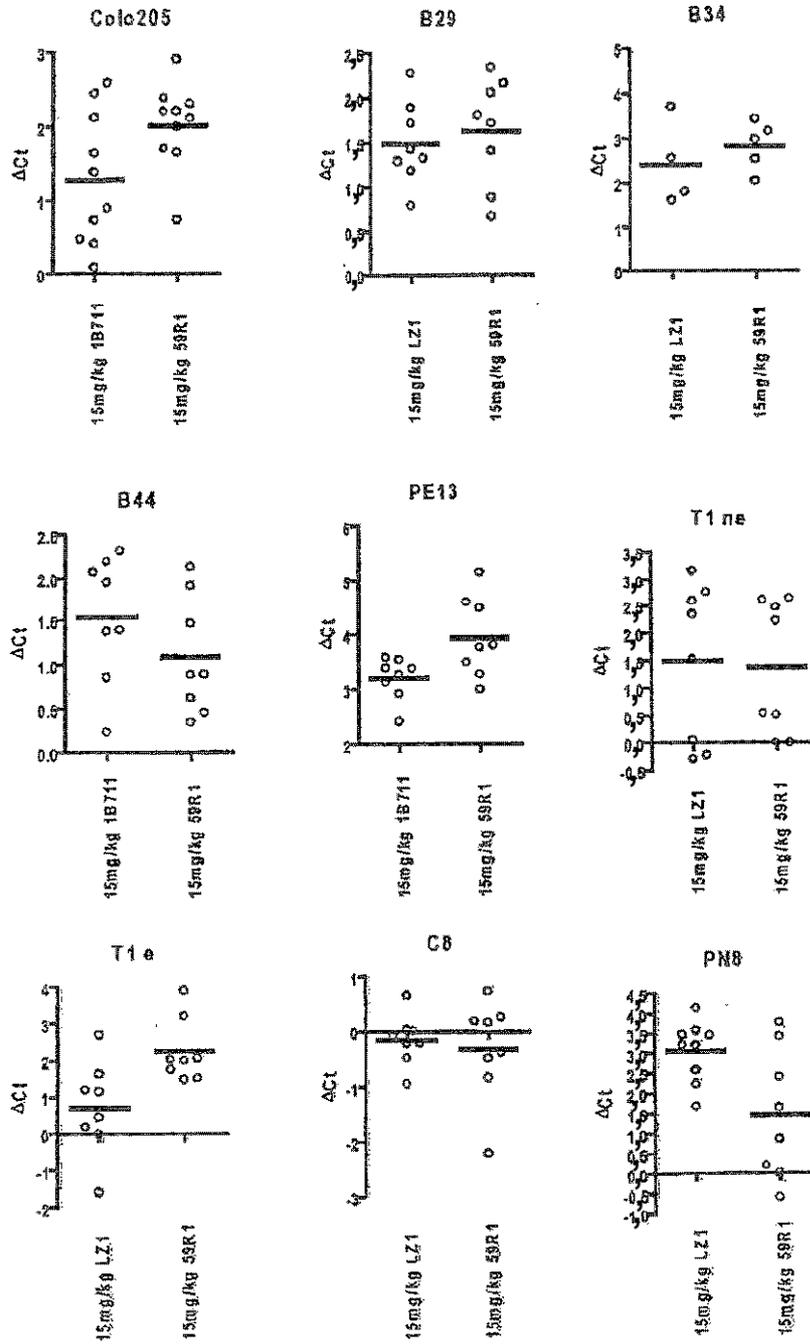


Figura 13

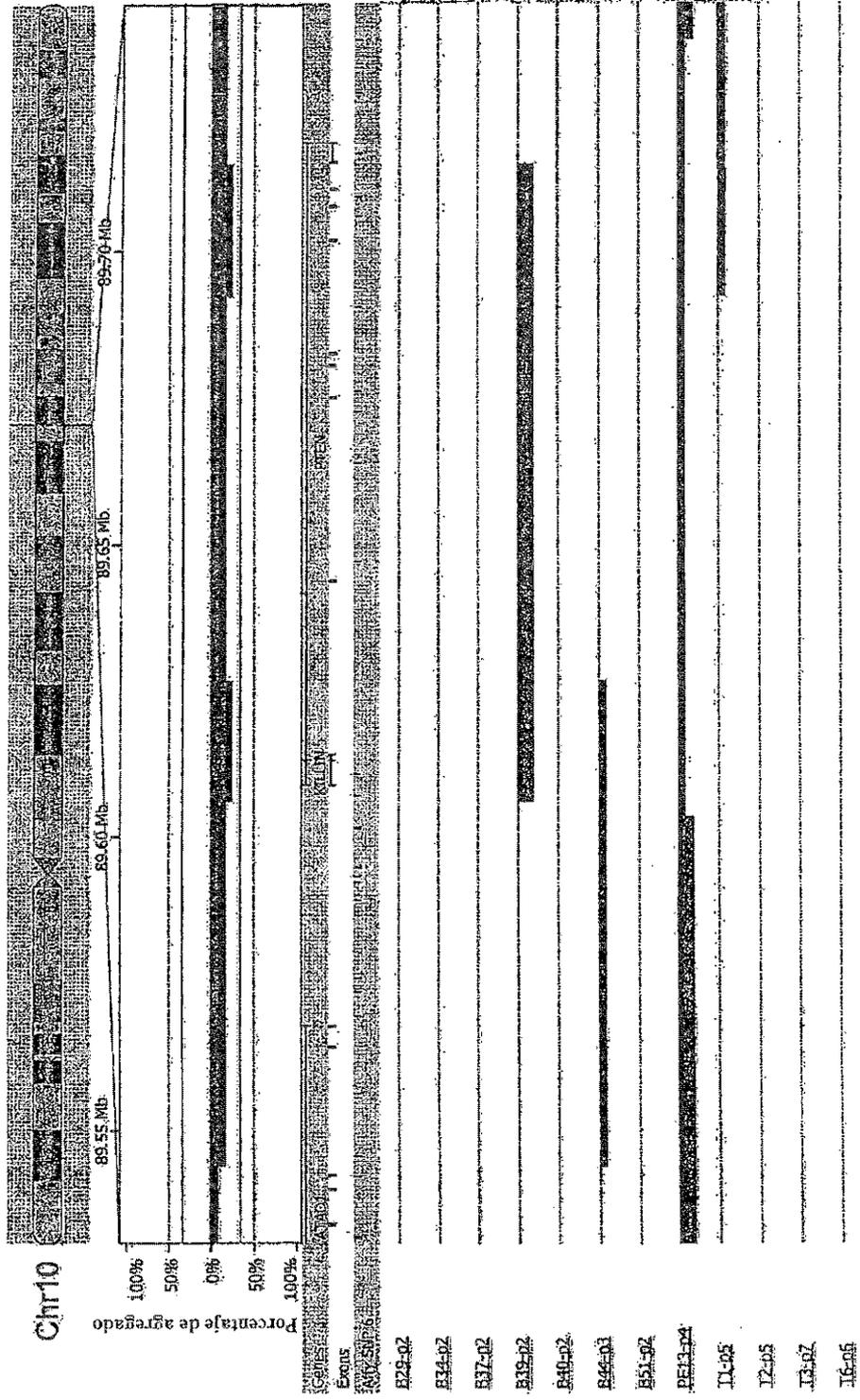


Figura 15A

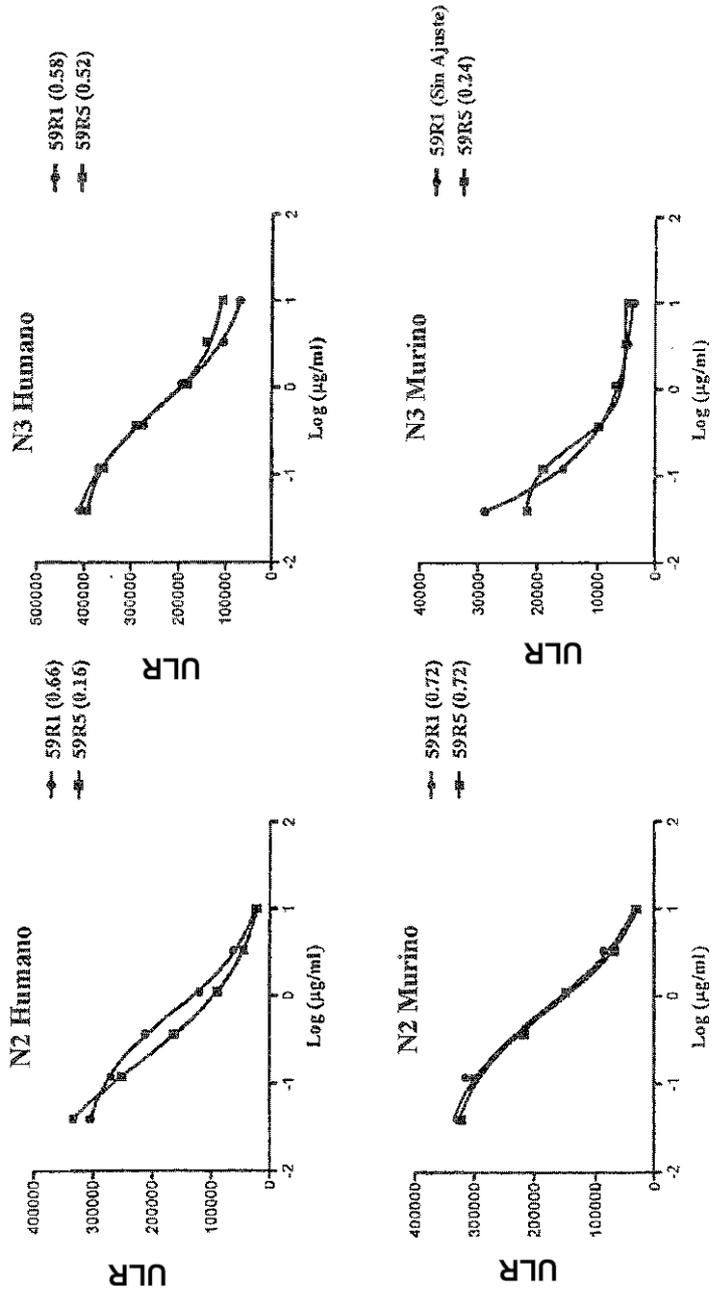


Figura 15B

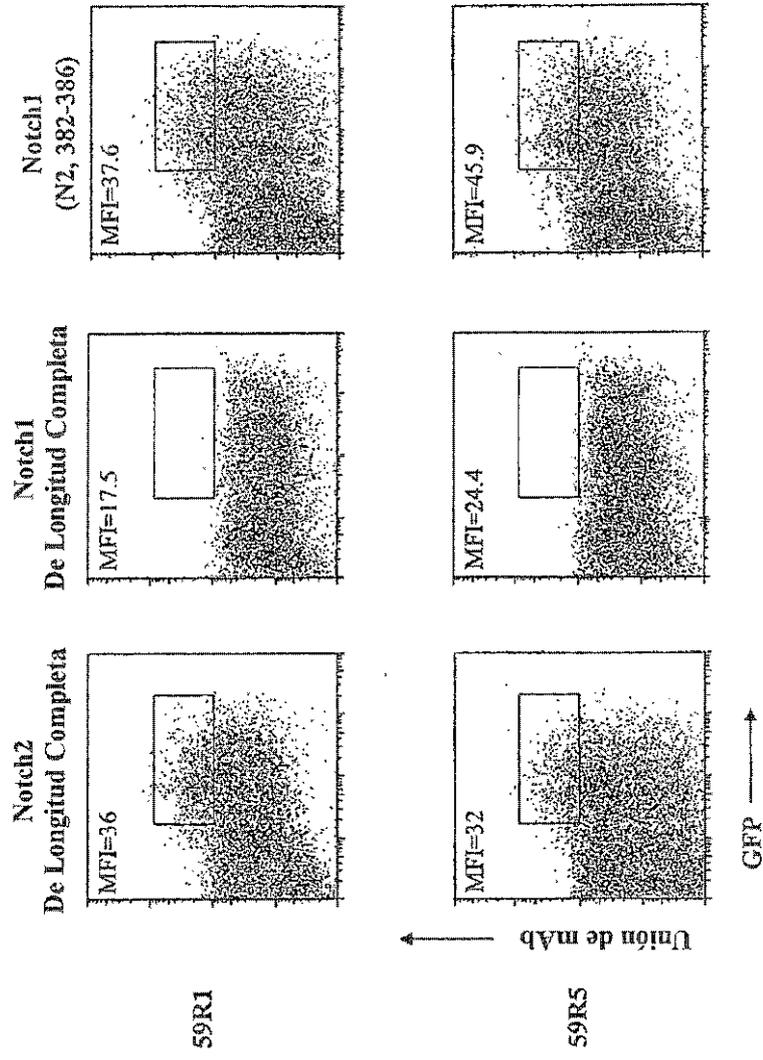


Figura 16

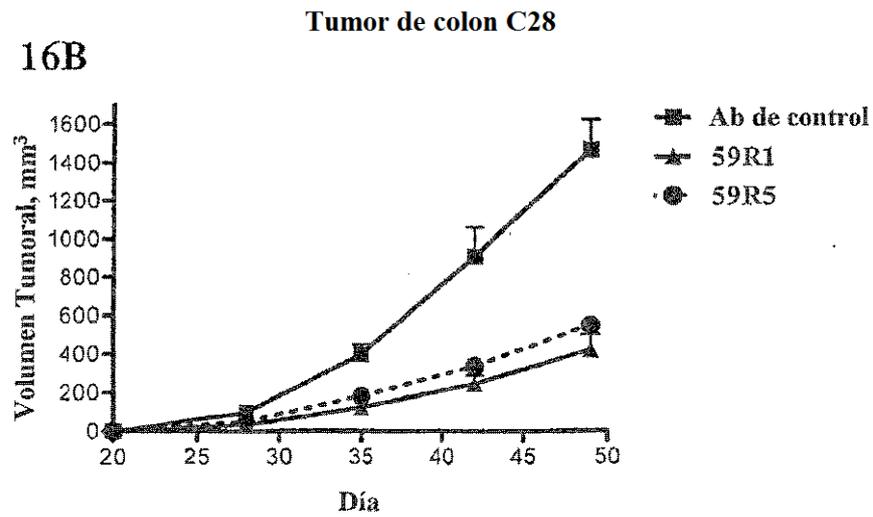
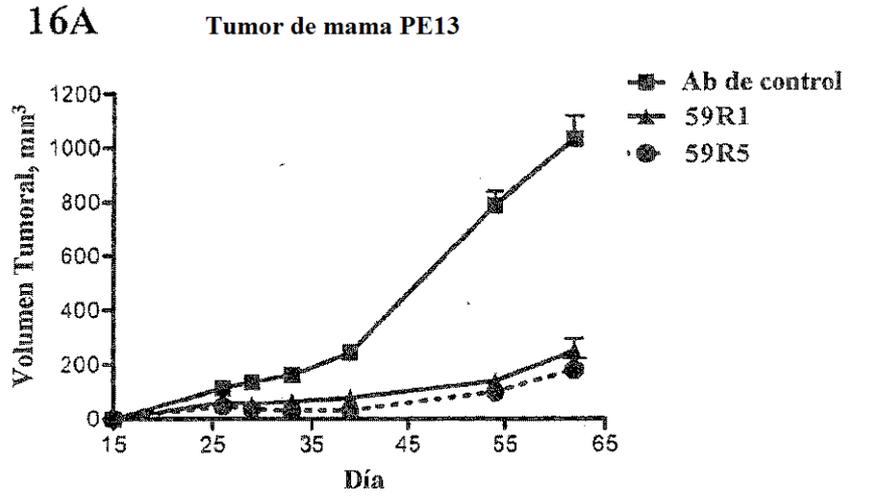


Figura 16

Tumor de colon COLO205

16C

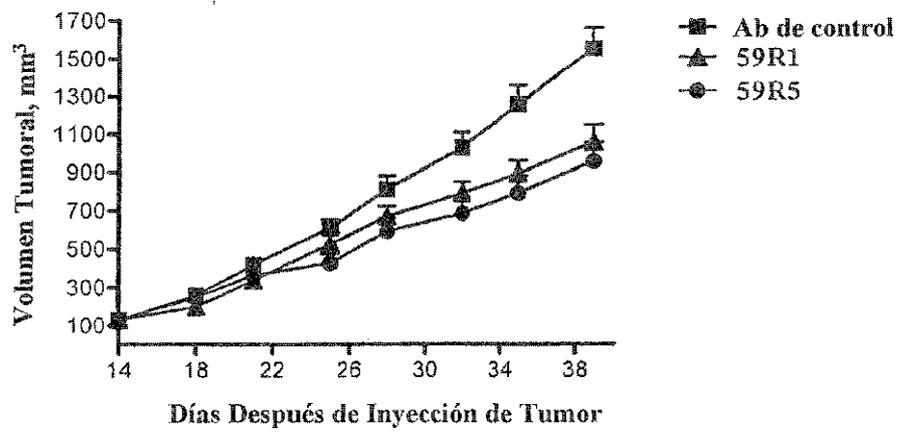
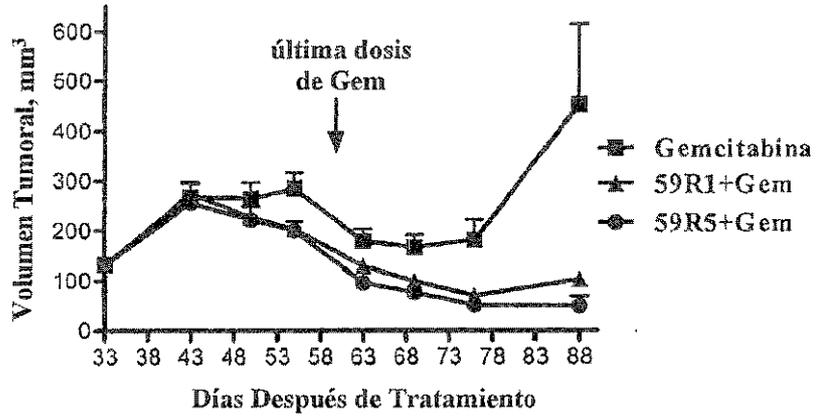


Figura 17

Tumor pancreático PN8

17A



Tumor mama P13

17B

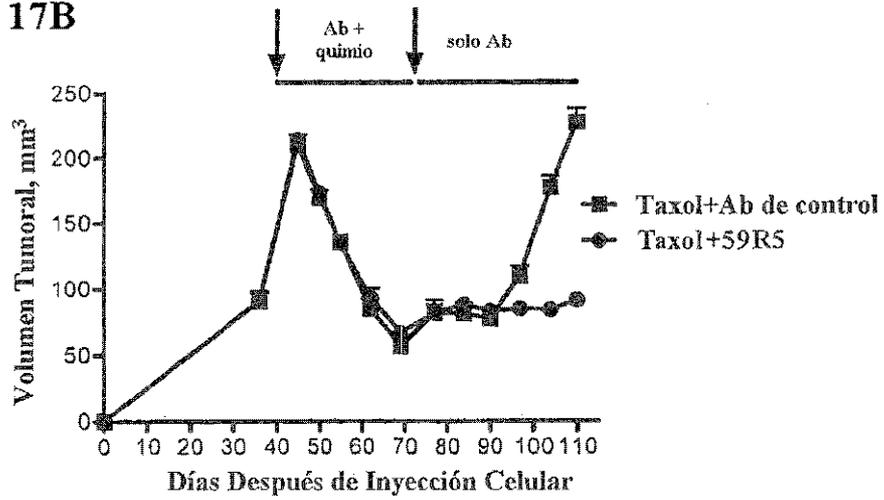


Figura 18

Estroma

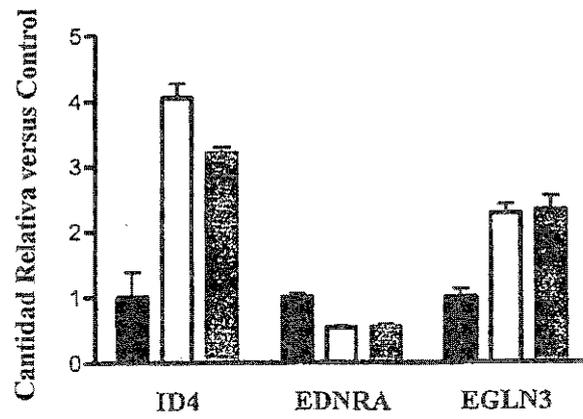
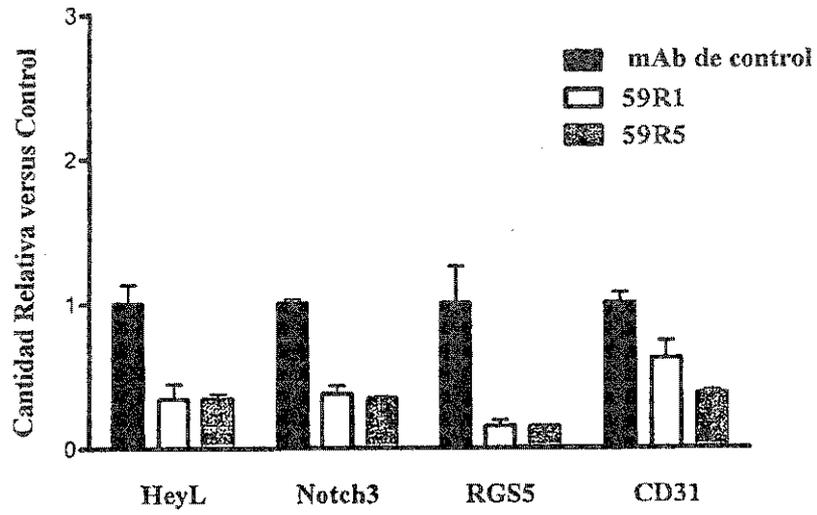
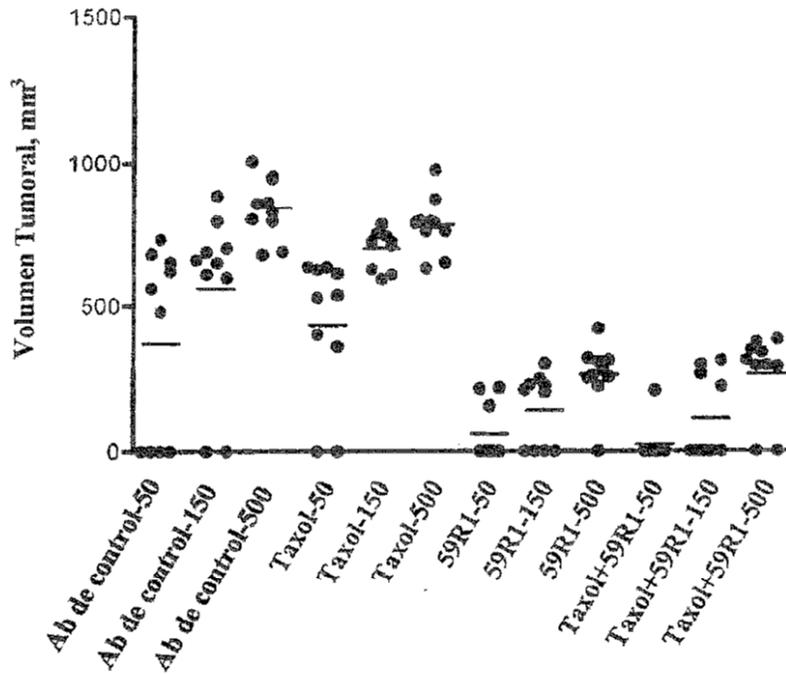


Figura 19

19A



19B

Día de crecimiento tumoral 75

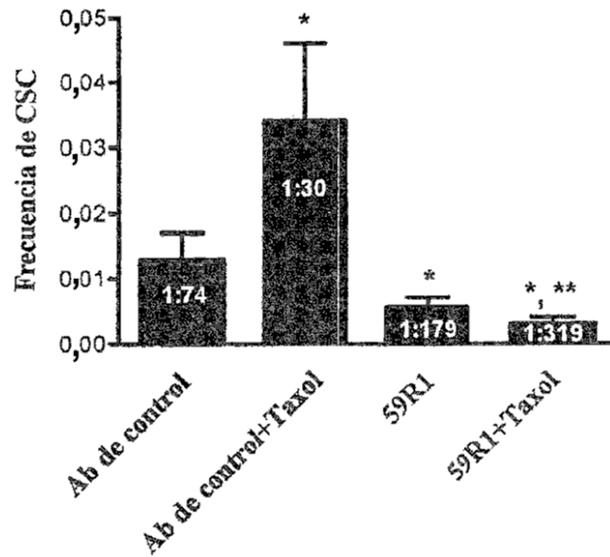
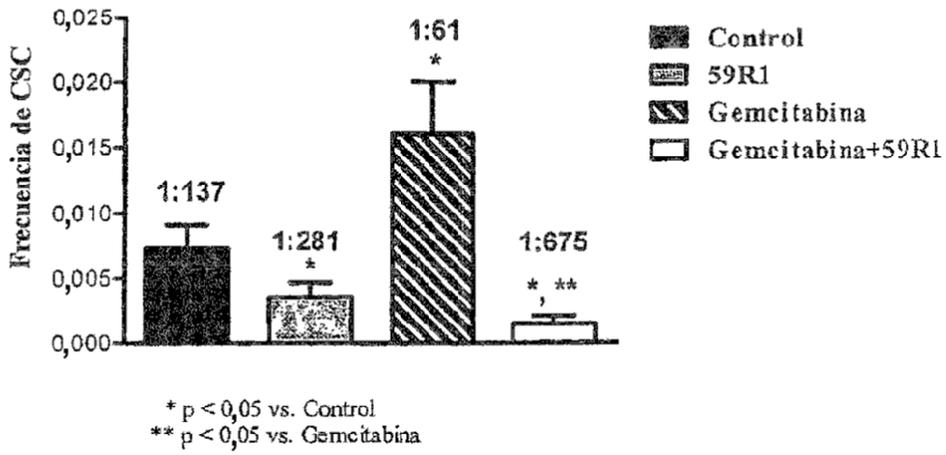


Figura 19

19C

Día de crecimiento tumoral 39



19D

Día de crecimiento tumoral 39

