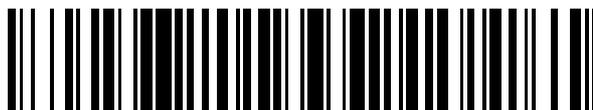


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 953**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007 E 07838966 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2066694**

54 Título: **Composiciones y métodos para diagnosticar y tratar cáncer**

30 Prioridad:

29.09.2006 US 847904 P

23.01.2007 US 886260 P

07.06.2007 US 942542 P

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

29.01.2016

73 Titular/es:

**ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 CHESAPEAKE DRIVE
REDWOOD CITY, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**GURNEY, AUSTIN;
HOEY, TIMOTHY;
SATYAL, SANJEEV y
AXELROD, FUMIKO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 557 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para diagnosticar y tratar cáncer

5 **Descripción de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la oncología y proporciona nuevas composiciones y métodos para diagnosticar y tratar cáncer. La presente invención proporciona anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer para la diagnosis y tratamiento de tumores sólidos.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas diagnosticadas con cáncer y 500.000 muertes por año solo en los Estados Unidos de América. En conjunto se estima que más de 1 de 3 personas desarrollará alguna forma de cáncer durante su vida. Hay más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de los cuales, de mama, de pulmón, colorrectal y de próstata, dan cuenta de más de la mitad de todos los nuevos casos (Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53:5-26).

20 El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres, con un 12 % estimado de mujeres en riesgo de desarrollar la enfermedad durante su vida. Aunque las proporciones de mortalidad han disminuido debido a detección temprana y tratamientos mejorados, el cáncer de mama permanece como una causa principal de muerte en mujeres de edad intermedia, y el cáncer metastásico de mama es aún una enfermedad incurable. En la presentación, la mayoría de los pacientes con cáncer metastásico de mama solo tienen uno o dos sistemas de órganos afectados, pero conforme progresa la enfermedad, usualmente se llegan a comprender múltiples sitios. Los sitios más comunes de implicación metastásica son reincidencias locoregionales y tejidos blandos de la pared torácica, así como en la axila y áreas supraclaviculares. El sitio más común para metástasis distante es el hueso (30-40 % de metástasis distante), seguido por los pulmones e hígado. Y aunque solo aproximadamente 1-5 % de las mujeres con cáncer de mama recién diagnosticado tienen metástasis distante en el momento de la diagnosis, aproximadamente el 50 % de los pacientes con enfermedad local recaen eventualmente con metástasis en el espacio de cinco años. En la actualidad, la supervivencia media a partir de la manifestación de la metástasis distante es aproximadamente tres años.

35 Los métodos actuales de diagnosis y clasificación en etapas del cáncer de mama incluyen el sistema de tumor-nódulo-metástasis (TNM) que depende del tamaño del tumor, de la presencia del tumor en los nódulos linfáticos, y de la presencia de metástasis distancia (American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual, Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5ª ed., 1997, pp 171-180; Harris, J R: "Staging of breast carcinoma" en Harris, J. R., Hellman, S.; Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases, Philadelphia, Lippincott, 1991). Se usan estos parámetros para proporcionar un pronóstico y para seleccionar una terapia apropiada. La apariencia morfológica del tumor también se puede valorar pero debido a que tumores con apariencia histopatológica similar pueden exhibir variabilidad clínica significativa, este planteamiento tiene serias limitaciones. Finalmente, se pueden usar ensayos para marcadores de superficie celular para dividir ciertos tipos de tumores en subclases. Por ejemplo, un factor considerado en el pronóstico y en el tratamiento del cáncer de mama es la presencia del receptor de estrógeno (ER) puesto que los canceres de mama positivos a ER responden normalmente de forma más fácil a terapias hormonales tal como tamoxifeno o inhibidores de aromatasa que los tumores negativos a ER. Aún estos análisis, aunque útiles, son solo parcialmente predictivos del comportamiento clínico de los tumores de mama, y hay mucha diversidad fenotípica presente en los canceres de mama que fallan en detectar las herramientas actuales de diagnóstico y fallan en tratar las terapias actuales.

50 El cáncer de próstata es el cáncer más común en los hombres en el mundo desarrollado, que representa un 33 % estimado de todos los nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos de América y es la segunda causa más frecuente de muerte (Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26). Desde la introducción de la prueba sanguínea de antígeno específico a próstata (PSA), la detección temprana de cáncer de próstata ha mejorado dramáticamente las proporciones de supervivencia; la proporción de supervivencia de cinco años para pacientes con canceres de próstata en etapa local y regional en el momento de la diagnosis es cercana a 100 %. Aún más de 50 % de los pacientes desarrollarán enfermedad localmente avanzada o metastásica (Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16)

60 Actualmente, la protatectomía radical y la terapia con radiación proporcionan tratamiento curativo para la mayoría de los tumores localizados de próstata. Sin embargo, las opciones terapéuticas están muy limitadas para los casos avanzados. Para la enfermedad metastásica, el tratamiento normal es la ablación de andrógenos con agonista de la hormona de liberación de la hormona luteinizante (LHRH), solo o en combinación con anti-andrógenos. Aún a pesar del bloqueo máximo de andrógenos, la enfermedad casi siempre progresa con la mayoría que desarrolle enfermedad independiente de andrógenos. En la actualidad, no hay tratamiento uniformemente aceptado para cáncer de próstata refractario a hormonas, y comúnmente se usan regímenes quimioterapéuticos (Muthuramalingam

et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16; Trojan et al., 2005, Anticancer Res. 25:551-61).

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común y la cuarta causa más frecuente de muertes por cáncer a nivel mundial (Weitz et al., 2005, Lancet 365:153-65). Aproximadamente 5-10 % de todos los cánceres colorrectales son hereditarios con una de las formas principales que es poliposis adenomatosa familiar (FAP), una enfermedad dominante autosómica en la cual aproximadamente el 80 % de los individuos afectados contienen una mutación de línea germinal en el gen de poliposis coli adenomatosa (APC). Los carcinomas colorrectales invaden localmente por crecimiento circunferencial y en otro sitio por propagación linfática, hematogénica, transperitoneal y perineural. El sitio más común de implicación extralinfática es el hígado, con los pulmones que es el órgano extra-abdominal más frecuentemente afectado. Otros sitios de propagación hematogénica incluyen los huesos, riñones, glándulas suprarrenales, y el cerebro.

El actual sistema de clasificación en etapas para cáncer colorrectal se basa en el grado de penetración tumoral a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de implicación nodal. Este sistema de clasificación en etapa se define por tres principales clasificaciones de Duke: enfermedad A de Duke se confina a capas submucosas de colon o recto; enfermedad B de Duke tiene tumores que invaden a través de la muscularis propia y pueden penetrar la pared del colon o recto; y la enfermedad C de Duke incluye cualquier grado de invasión de la pared intestinal con metástasis regional de los nódulos linfáticos. En tanto que la resección quirúrgica es altamente efectiva para cánceres colorrectales de etapa temprana, que proporciona proporciones de curación de 95 % en pacientes con A de Duke, la proporción se reduce a 75 % en pacientes con B de Duke y la presencia del nódulo linfático positivo en la enfermedad C de Duke predice una probabilidad del 60 % de reincidencia en el espacio de cinco años. El tratamiento de los pacientes con C de Duke con un curso pos-quirúrgico de quimioterapia reduce la proporción de reincidencia a 40-50 % y ahora es la norma de cuidado para estos pacientes.

El cáncer de pulmón es el cáncer más común a nivel mundial, el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado en los Estados Unidos de América, y por mucho la causa más frecuente de muerte por cáncer (Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-96; Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53-5-26). Se cree que el fumar cigarrillos es responsable de un 87 % estimado de todos los cánceres de pulmón haciéndolo la enfermedad más mortalmente prevenible. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales que dan cuenta de más de 90 % de todos los cánceres de pulmón: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). El SCLC da cuenta de 15-20 % de los casos y se caracteriza por su origen en las vías aéreas centrales grandes y composición histológica de laminillas de células pequeñas con poco citoplasma. El SCLC es más agresivo que el NSCLC, creciendo rápidamente y metastatizándose de forma temprana. El NSCLC da cuenta de 80-85 % de todos los casos y se divide adicionalmente en tres subtipos principales basándose en la histología: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), y carcinoma indiferenciado de células grandes.

El cáncer de pulmón se presenta normalmente tardío en su curso, y de esta manera tiene una supervivencia media de solo 6-12 meses después de la diagnosis y una proporción total de supervivencia de 5 años de solo 5-10 %. Aunque la cirugía ofrece la mejor probabilidad de una curación, solo una pequeña fracción de los pacientes con cáncer de pulmón son elegibles con la mayoría que dependen de la quimioterapia y de la radioterapia. A pesar de los intentos para manipular la sincronización e intensidad de dosis de estas terapias, las proporciones de supervivencia se han incrementado poco durante los últimos 15 años (Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-96).

Estos cuatro cánceres, así como muchos otros, se presentan como tumores sólidos que se componen de poblaciones de células heterogéneas. Por ejemplo, los cánceres de mama son una mezcla de células de cáncer y células normales, incluyendo células mesenquimatosas (estromales), células inflamatorias y células endoteliales). Varios modelos de cáncer proporcionan diferentes explicaciones de la presencia de esta heterogeneidad. Un modelo, el modelo clásico de cáncer, sostiene que las poblaciones de células de cáncer fenotípicamente distintas tienen todas, la capacidad de proliferar y dar lugar a un nuevo tumor. En el modelo clásico, la heterogeneidad de las células tumorales resulta de factores ambientales así como de mutaciones corrientes dentro de las células de cáncer que dan por resultado una población diversa en células tumorigénicas. Este modelo se apoya en la idea que todas las poblaciones de células tumorales tienen algún grado de potencial tumorigénico. (Pandis et al., 1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129; Kuukasjärvi et al., 1997, Cancer Res. 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, Cancer 71:382-391; Bonsing et al., 2000, Genes Chromosomes & Cancer 82: 173-183; Beerman H et al., 1991, Cytometry 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, Analyt. Cell. Path. 19:53; Shen L et al., 2000, Cancer Res. 60:3884).

Un modelo alternativo para la heterogeneidad observada de las células tumorales sólidas se deriva del impacto de las células madre en el desarrollo tumoral. De acuerdo a este modelo, el cáncer surge de la desregulación de los mecanismos que controlan el desarrollo y mantenimiento normal del tejido. (Beachy et al., 2004, Nature 432:324). Durante el desarrollo normal del animal, las células de la mayoría o de todos los tejidos se derivan de precursores normales, llamados células madre (Morrison et al., 1997, Cell 88:287-98; Morrison et al., 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:216-21; Morrison et al., 1995, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11:35-71). Estas células madre son células que: (1) tienen capacidad proliferativa extensiva; 2) son capaces de división celular asimétrica para generar una o mas clases

de progenie con potencial proliferativo y/o evolucionista reducido; y 3) son capaces de divisiones celulares simétricas para auto-renovación o auto-mantenimiento. El ejemplo mejor estudiado de renovación de células adultas por la diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético donde los precursores evolucionistamente inmaduros (células progenitoras y madre hematopoyéticas) responden a señales moleculares para formar tipos variados de células linfoides y sanguíneas. Otras células, incluyendo células del intestino, sistema ductal de mama, y piel se reabastecen constantemente de una pequeña población de células madre en cada tejido, y estudios recientes sugieren que la mayoría de los otros tejidos adultos también tienen células madre, incluyendo el cerebro. Los tumores derivados de una "célula madre de tumor sólido" (o "célula madre de cáncer" de un tumor sólido) se someten subsiguientemente a desarrollo caótico a través de rondas tanto simétricas como asimétricas de divisiones celulares. En este modelo de células madre, los tumores sólidos contienen un subconjunto distinto y limitado (posiblemente aún raro) de células que comparten las propiedades de "células madre" normales, ya que proliferan de manera extensiva y dan lugar de manera eficiente tanto a células madre adicionales de tumor sólido (auto-renovación) y a la mayoría de células tumorales de un tumor sólido que carecen de potencial tumorigénico. En realidad, las mutaciones dentro de una población de células madre de larga vida pueden iniciar la formación de células madre de cáncer que son la base del crecimiento y mantenimiento de tumores y cuya presencia contribuye a la falla de los planteamientos terapéuticos actuales.

La naturaleza de células madre del cáncer se reveló primero en el cáncer de sangre, leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) (Lapidot et al., 1994, Nature 17:645-8). Más recientemente, se ha demostrado que los tumores malignos de mama y colon, humanos, tienen similarmente una población pequeña, distinta de células madre de cáncer enriquecidas por la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes. Una población de células Lin ESA+, CD44+, CD24-baja, en tumores de mama se encontró que está enriquecida 50 veces para células tumorigénicas en comparación a células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., 2003, Proc. Nat'l Acad. Sci. 100:3983-8). De manera similar, la subpoblación ESA+, CD44+ en tumores colorrectales se encontró que incluye de forma única células tumorigénicas, y la adición de CD166 a este perfil fue capaz de enriquecer adicionalmente células madre de cáncer de colon (CoCSC) (Dalerba et al. 2007 Proc Nat'l Acad Sci 104:10158-63). Se ha notificado que el bloqueo de DLL4 con un anticuerpo selectivo de DLL4 inhibe el crecimiento tumoral en varios modelos animales (Ridway et al (2006) Nature 44 1083-1087). La capacidad para aislar de forma eventual las células tumorigénicas de cáncer ha permitido la investigación de rutas biológicas críticas que son la base de la tumorigenicidad en estas células, y promete de esta manera el desarrollo de mejores ensayos de diagnóstico y productos terapéuticos para pacientes con cáncer. Es hacia este propósito que se dirige esta invención.

Resumen

Se proporcionan anticuerpos que se unen de manera específica a un epítipo de ligando 4 tipo Delta (DLL4) humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27) y el dominio DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde el anticuerpo afecta el crecimiento tumoral. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente se proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva y un anticuerpo de DLL4 de la presente descripción. Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 como se establece en la reivindicación 1.

Los objetos y ventajas adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o se pueden aprender por la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se realizarán y lograrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones anexas. Se va a entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo de ejemplo y explicativas y no son restrictivos de la invención, como se reivindica. Las figuras anexas, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias formas de realización de la invención, y conjuntamente con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En la especificación y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", y "el (la)" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Unión Específica de anticuerpo 21M18 anti-DLL4 a proteína nativa de DLL4 de superficie celular. Con los anticuerpo anti-DLL4 y clasificado por FACS se incubaron células HEK 293 co-transfectadas con DLL4 de longitud completa y GFP. Los anticuerpos 21M14 y 21M18 anti-DLL4 muestran unión específica a células que expresan DLL4 como se revela por la relación lineal entre la unión del anticuerpo DLL4 y la expresión de GFP.

Figura 2: Anticuerpos de DLL4 bloquean la interacción de DLL4 humano con el Receptor Notch. 2A) Se incubaron células HEK 293 que expresan DLL4 con Notch-Fc o proteína Fc de control en la presencia de anticuerpos de control o DLL4. La alta intensidad de fluorescencia indica la presencia de la unión de DLL4 y Notch en la presencia de un anticuerpo de control (línea 1) y anticuerpos 21M12 anti-DLL4 (línea 5). La baja intensidad de fluorescencia indica la ausencia de interacciones de DLL4 y Notch en la ausencia de Notch (línea 1) y la interrupción de las interacciones de DLL4 y Notch en la presencia de anticuerpos 21M18 (línea 3) y 21M14 (línea 4) anti-DLL4. 2B) Con DLL4-Fc ya sea humano o murino se incubaron células HEK 293 que expresan Notch1. Se detectó la unión por anti-Fc fluorescentemente marcado y se analizó por FACS, con la alta intensidad

de fluorescencia indicativa en la unión entre células que expresan Notch1 y DLL4. 21M18 bloquea la unión de DLL4 humano (cuadros grises) pero no DLL4 murino (círculos negros) al receptor de Notch.

Figura 3: Mapeo de epítomos de anticuerpos anti-DLL4. 3A) Proteínas de fusión con supresiones anidadas del dominio intracelular de DLL4 humano se incubaron en un ensayo de ELISA con los anticuerpos 21M14 y 21M18 anti-DLL4. No se detectó la unión por arriba del fondo en la presencia de proteínas de fusión que contienen entre los aminoácidos 1 a 154 (aa 1-96), barra blanca con puntos negros; aa 1-154, barra negra con puntos blancos). En contraste, se encontró la unión entre anticuerpos anti-DLL4 y todas las proteínas de fusión que contienen entre aminoácidos 1 a 217, incluyendo el dominio DSL, de DLL4 (aa 1-217), barra rayada horizontal; aa 1-251, barra rayada diagonal; aa 1-283, barra sombreada; aa 1-323, barra gris con puntos blancos). 3B) Las transferencias Western muestra la expresión de proteínas de supresión C-terminales de DLL4 humano (h-DLL4) y proteínas de fusión quiméricas de DLL4 humano-murino (anti-hFc; parte superior). Las proteínas de fusión de DLL4 comprenden uno o más dominios 1 a 6, donde los dominios 1 y 2 son aminoácidos 1 a 154 N-terminales; el dominio 3 es el dominio DSL desde los aminoácidos 155 a 217; y los dominios 4, 5 y 6 son cada uno un dominio EGF como se representa gráficamente en C. Los anticuerpos 21M18 reconocen la proteína de h-DLL4 solo en la presencia de los aminoácidos 1-217 (hDLL4dom 1-3). En contraste a la proteína humana, las proteínas de fusión que comprenden los aminoácidos 1-214 (dom 1-3) de DLL4 murino (m-DLL4) no se reconocen por 21M18 (m-DLL4 dom1-3:h-DLL4dom4-6). Aún las proteínas de fusión que comprenden los aminoácidos 1-154 (dom1-2) de h-DLL4 en la presencia de dom3 murino se reconocen por 21M18 (h-DLL4 dom1-2:mDLL4dom3-6). 3C) Se muestra en un resumen esquemático de los datos de unión de B. La estructura de dominio de DLL4 se muestra en la parte superior con las proteínas de fusión de DLL4 listadas y mostradas esquemáticamente del lado izquierdo con la proteína humana representada por gris claro y la proteína de ratón representada por gris oscuro. La unión de 21M18 a cada fragmento de DLL4 se indica por un "+" versus un "-". 3D) Análisis de ELISA de la unión de 21M18 a fragmentos de proteína de DLL4 que contienen sustitución de residuos murinos correspondientes por residuos humanos en posiciones seleccionadas. 21M18 presenta unión deteriorada a fragmentos de proteína de DLL4 con sustituciones en los aminoácidos 68, 69, y 71 (reemplazo de valina, valina, y prolina) o en los aminoácidos 142 y 144 (reemplazo de lisina y alanina). 3E) Análisis de ELISA de la unión de los anticuerpos 21M18 y 21M21 a los fragmentos de proteína de DLL4 que contienen sustitución de los correspondientes residuos murinos por residuos humanos en posiciones seleccionadas dentro del dominio DSL. El anticuerpo 21M21 presenta unión deteriorada a los fragmentos de proteína de DLL4 humano que contienen sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos 161 y 162 (reemplazo de treonina y serina). Puesto que 21M21 no deteriora la función de DLL4 en los ensayos de señalización (ver Figura 6), esto demuestra que no todos los anticuerpos que se unen a la región DSL impactan la función de DLL4.

Figura 4: Alineación de secuencia de la región variable de cadena pesada. 4A) Secuencia de anticuerpo 21M21 murino parental (m-21M18-Vh, parte superior), secuencia de soporte expresada, humana (h-EST-soporte, intermedia) y secuencia de región variable de cadena pesada de 21M18 humanizada (21M18-H7, fondo) se muestran con residuos de aminoácido conservados sombreados en negro. Las tres CDR se marcan mostrando retención de secuencias murinas parentales en el anticuerpo 21M18 humanizado. El residuo de cisteína en la posición 52a de Kabat en CDR2 se ha cambiado a un residuo de serina y valina sin pérdida de unión específica a DLL4 en 21M18 H7 y 21M18 H9, respectivamente. Las sustituciones dentro de la región marco, mostradas en 4A se numeran 1-6 con las posiciones de Kabat correspondiente en la cadena de Vh 16, 20, 27, 28, 38, 48. 4B) Secuencia de anticuerpo 21M18 murino parental (m-21M18-Vh, parte superior), secuencia de Vh de línea germinal humana (h-línea germinal-Vh, intermedia), y la secuencia de región variable de cadena pesada de 21M18 humanizada (21M18-H2, fondo), se muestran con residuos de aminoácidos conservados sombreados en negro. Las tres CDR se marcan mostrando retención de secuencias murinas parentales en el anticuerpo 21M18 humanizado. El residuo de cisteína en la posición 52a de Kabat en CDR2 se ha cambiado a una serina y a un residuo de valina sin pérdida de unión específica a DLL4 en 21M18 H7 y 21M18 H9, respectivamente. Los cinco residuos murinos retenidos dentro de la región marco variable de todas las variantes de cadenas pesadas se numeran 1-5 en sus correspondientes posiciones de Kabat 20, 28, 38, 48 y 69.

Figura 5: Alineación de secuencia de la región variable de cadena ligera. Secuencia de anticuerpos 21M18 murino parental (m-21M18-Vk, parte superior), secuencia de línea germinal humana (h-línea germinal Vk, fondo), y secuencia de región variable de cadena ligera de 21M18 humanizada (21M18-L2, intermedia) se muestran con residuos de aminoácido conservados sombreados en negro. Las tres CDR se marcan mostrando la retención de secuencias murinas parentales en el anticuerpo 21M18 humanizado. Los dos residuos murinos retenidos dentro de la región marco, variable se numeran 1-2 en sus correspondientes posiciones de Kabat 22 y 36.

Figura 6: Señalización Notch de Bloque de Anticuerpos de DLL4. Se incubaron células HeLa co-transfectadas con el indicador Hes1-Luc y vectores de indicador de luciferasa de Renilla con la proteína de DLL4 en la presencia o ausencia de anticuerpos anti-DLL4. Niveles disminuidos de luciferasa demostraron pérdida de activación de ruta Notch de DLL4 por los anticuerpos 21M14 y 21M18.

Figuras 7: Anticuerpos de DLL4 Modulan la Expresión de Genes Objetivos Notch en Tumores de Colon. 7A) Se aislaron tumores de colon C8 tratados con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 o PBS (Control) y la expresión de HES1 y ATOH-1 determinada por RT-PCR cuantitativa. La expresión génica relativa (eje y) en comparación a células tratadas con control muestra que el tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 disminuyó la expresión de HES1 e incrementó la expresión de ATOH-1. 7B) Se muestra la relación de expresión relativa (eje y) de HES1 versus ATOH1 en colonias de células de tumores de colon OMP-C11 agotadas en linaje de ratón. Las colonias C11 cubiertas con células 3T3 que expresan DLL4 (3T3+DLL4) mostraron un incremento en la relación de expresión de HES1/ATOH1 en comparación a células de colon cubiertas con células 3T3 (3T3) o no expuestas a la cubierta

con células (control). Este incremento en la relación de expresión de HES1/ATOH1 se eliminó por incubación con 10 µg/mL de anticuerpos 21M18 (21M18) o inhibidor DBZ de secretasa 5 µM (GSI 5 µM).

Figura 8: Anticuerpos de DLL4 Reducen Crecimiento Tumoral. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células UM-C4 disociadas y se trataron con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 (n=5) o PBS (n = 10). El tratamiento con anticuerpos 21M18 (diamantes) redujo el crecimiento tumoral iniciando el día 23, y se observó una reducción de hasta 54 % por el día 48 en comparación a controles inyectados con PBS (cuadros negros).

Figura 9: Tratamiento con Anticuerpos de DLL4 Reduce el Número de Células Tumorales Proliferantes *in vivo*. Se aislaron tumores de colon C8 tratados con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 o Ab de control. La inmunocitoquímica con un anticuerpo contra Ki67 mostró una reducción en el número de células proliferantes en tumores tratados con 21M18 en comparación al control.

Figuras 10: Tratamiento con Anticuerpos de DLL4 en Combinación con Fluorouracilo (5-FU) Reduce Crecimiento Tumoral. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células UM-C4 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o PBS en la presencia o ausencia de 5-FU. 10A) El tratamiento con anticuerpos 21M18 en combinación con 5-FU (círculos, línea punteada) reduce el crecimiento tumoral 46 días después de la inyección de células tumorales a un mayor grado del tratamiento con ya sea 5-FU (triángulos, línea continua) o anticuerpos 21M18 (diamantes, línea punteada) solos y a un mayor grado que los controles inyectados con PBS (cuadrados, línea continua). El volumen del tumor en mm³ se indica en el eje y. 10B) Gráficas de mediciones tumorales en el día 46 de animales individuales. Cada punto representa un animal. El tratamiento con anticuerpos 21M18 o 5-FU redujo cada uno el tamaño de tumor (mm³) en comparación al control. Adicionalmente, el tratamiento de combinación con anticuerpos 21M18 y 5-FU tuvo un efecto aditivo, reduciendo el tamaño del tumor a 1/5 del tamaño de control.

Figura 11: Tratamiento con Anticuerpos de DLL4 en Combinación con Anticuerpos anti-EGFR Reduce el Crecimiento Tumoral. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células UM-C4 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o PBS en la presencia o ausencia de anticuerpos anti-EGFR. Las gráficas de mediciones tumorales en el día 46 de animales individuales se muestran. Cada punto representa un animal. El tratamiento con anticuerpos 21M18 o anticuerpos anti-EGFR redujo cada uno al tamaño de tumor (mm³) en comparación al control. Adicionalmente, el tratamiento de combinación con 21M18 y anticuerpos anti-EGFR tuvo un efecto aditivo, reduciendo el tamaño del tumor a menos de 1/5 el tamaño de control.

Figuras 12: mAb 21M18 anti-DLL4 e irinotecán actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento del tumor de Colon. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células C8 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o anticuerpo de control en la presencia o ausencia de irinotecán. 12A) El tratamiento con anticuerpos 21M18 murinos (círculos) o irinotecán (triángulos) redujo cada uno solo el volumen de tumor (eje y mm³) en comparación a animales tratados con control (cuadros negros). Sin embargo, el tratamiento de combinación con 21M18 e irinotecán (triángulos inversos) tiene un efecto sinérgico, eliminando completamente el crecimiento tumoral durante hasta 55 días pos-inyección de células. 12B) El tratamiento con 21M18 humanizado (h21M18) en combinación con irinotecán (irctn) (círculos) tiene eficiencia similar como 21M18 murino (h21M18) (triángulo) en comparación a anticuerpos de control (cuadros negros) o anticuerpo de control con irinotecán (triángulo).

Figura 13: Tratamiento de Combinación con 21M18 anti-DLL4 e irinotecán Previene el Re-Crecimiento de Tumor de Colon. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células C8 disociadas y se trataron con Irinotecán o Irinotecán en combinación con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 (n = 10) por grupo). 13A) El tratamiento con Irinotecán solo desacelera el crecimiento de tumor de colon, pero el crecimiento continúa después del cese del tratamiento en el día 56 (* flecha) en todos menos dos animales tratados. 13B) En contraste, el tratamiento con una combinación de Irinotecán y anticuerpos 21M18 anti-DLL4 eliminó el crecimiento de tumor de colon tanto durante el tratamiento como durante hasta cinco semanas después del cese del tratamiento en el día 56 en los diez animales tratados. Cada línea representa la curva de crecimiento para un animal individual.

Figura 14: Tratamiento de Combinaron de 21M18 anti-DLL4 e Irinotecán Inhibe el Crecimiento de Tumores Establecidos de Colon de Manera Más Efectiva que el Tratamiento de Terapia Única. Se inyectaron ratones NOD/SCID con células C8 disociadas y se trataron con anticuerpos anti-DLL4 o anticuerpo de control en la presencia o ausencia de Irinotecán. El tratamiento con anticuerpos 21M18 (diamantes) o Irinotecán (triángulos) solo redujo cada uno el volumen de tumor (eje y, mm³) en comparación a animales tratados con control (cuadros negros) Sin embargo, el tratamiento de combinación con 21M18 más Irinotecán (triángulos inversos) inhibió el crecimiento de tumor más efectivamente que ya sea el tratamiento único con 21M18 o con Irinotecán.

Figuras 15: Tumores Tratados con Anticuerpos Anti-DLL4 Muestran Números Disminuidos de Células Tumorigénicas. Se inyectaron ratones inmunocomprometidos (n = 10 por grupo) con dosis decrecientes de células tumorales del experimento mostrado en la Figura 14 que se ha tratado con ya sea anticuerpo de control, Irinotecán más anticuerpo de control, anticuerpos 21M18 de DLL4 solos, o una combinación de anticuerpos 21M18 de DLL4 e Irinotecán (Combinación). 15A) Resultados de tumor toman velocidad en el día 81. Se graficó el volumen del tumor (mm³) en comparación al número de células tumorales humanas inyectadas: 900, 300, 100 y 50 para cada grupo de tratamiento. El número de animales con tumores detectables sobre los diez animales inyectados para cada dosis de células tumorales se registra por abajo de la gráfica de volumen de tumor para cada dosis de células con células tumorales tratadas con control a la izquierda (círculos rellenos), células tumorales tratadas con anticuerpo 21M18 anti-DLL4 segundas a la izquierda (cuadros abiertos), células tumorales tratadas con Irinotecán segundas a la derecha (triángulos rellenos), y células tumorales tratadas con combinación a la derecha (círculos abiertos). 15B) Se calculó la frecuencia de células madre en el día 81. La proporción de células madre de cáncer (eje y) de células tumorales tratadas con control (izquierda) en comparación a tratadas con anti-DLL4 (segundo de izquierda), solo tratadas con Irinotecán (segundo de

derecha), y tratadas con combinación (derecha) se grafica con el intervalo de confianza de 95 %. El grupo tratado con anti-DLL4 tiene una diferencia estadísticamente significativa versus el grupo de control (*) y el grupo de combinación es significativamente diferente versus tanto grupo de control (*) como grupo con Irinotecán solo (**).

5 Figura 16: Tratamiento de Combinación con 21M18 Anti-DLL4 e Irinotecán Retrasa Reincidencia de Tumor. Se inyectaron ratones inmunocomprometidos con células C8 disociadas y tumores establecidos de aproximadamente 150 mm³ se trataron con una combinación de Irinotecán (45 mg/kg, dosificado dos veces por semana) con ya sea anticuerpos 21M18 anti-DLL4 o anticuerpos de control durante 32 días después de lo cual se detuvo el tratamiento con Irinotecán. El tratamiento con ya sea el anticuerpo de control o 21M18 continuó. Se retrasó la reincidencia de tumores por volumen tumoral (eje y) en animales tratados con 21M18 (triángulos) en comparación a controles (círculos).

10 Figura 17: Tratamiento de Combinación con 21M18 Anti-DLL4 e Irinotecán Retrasa Reincidencia de Tumor. Se muestran los animales individuales del experimento mostrado en la Figura 16. El volumen total de tumor (eje y) de cada animal se muestra 47 días después de la terminación de tratamiento con Irinotecán.

15 Figura 18. La Combinación con 21M18 anti-DLL4 y anti-VEGF Reduce el Crecimiento de Tumor. Se implantaron células tumorales C17 y se inició el tratamiento dos días después con ya sea anticuerpo de control (cuadros negros, línea continua), 21M18 (triángulos, línea punteada), anti-VEGF (diamantes, línea continua), o la combinación de ambos anticuerpos (círculos, línea punteada). Cada anticuerpo se dosificó a 10 mg/kg, dado dos veces por semana y hubo 10 animales por grupo. Tanto 21M18 como anti-VEGF redujeron el crecimiento tumoral y la combinación fue más efectiva que cualquier anticuerpo solo.

Descripción de las formas de realización

25 El término "anticuerpo" se usa para querer decir una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidratos, polinucleótido, lípido, o combinaciones de lo anterior a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos antagonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer e interfieren con, por ejemplo, la unión de ligando, dimerización de receptor, expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer, y/o señalización de etapa posterior de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos incluyen anticuerpos agonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer y promueven, por ejemplo, la unión de ligando, la dimerización de receptor, y/o la señalización por una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos no interfieren con o no promueven la actividad biológica de una proteína marcadora de células madre de cáncer pero inhiben el crecimiento tumoral por ejemplo por internalización del anticuerpo y/o por reconocimiento por el sistema inmunitario. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (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, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula modificada de inmunoglobulina que comprenda 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), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras diferentes y bien conocidas de subunidades y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden estar descubiertos o conjugados a otras moléculas tal como toxinas, radioisótopos, etc.

50 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 anticuerpo 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.

55 Un "anticuerpo de Fv" se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento a antígeno ya sea como dos cadenas, en la cual un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera forman un dímero no covalente, o como una cadena individual (scFv), en la 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 dimerica 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.

65 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, y Fv), mutantes de cadena individual (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula modificada de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno.

5 Adicionalmente, "anticuerpo monoclonal" se refiere a estos anticuerpos hechos de cualquier número de maneras que incluyen, pero no se limitan a por hibridoma, selección en fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas. Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) dentro de la región de determinación de antígeno (o región hipervariable) de la región variable de una cadena o cadenas de anticuerpos se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad deseada, afinidad deseada y capacidad deseada. En algunos casos, los

10 residuos de la región marco (FR) de cadena variable 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 marco variable y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá

15 sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres o cuatro, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones de CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana en tanto que todas o sustancialmente todas las regiones de FR son aquéllas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o dominio (Fc), normalmente aquélla de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos

20 usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente de Estados Unidos número 5.225.539.

El término "anticuerpo humano" 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 hecho usando cualquier técnica conocida. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de

30 longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humana tal como por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena pesada humana y de cadena ligera murina.

"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 se unen por el tetrámero resultante.

35

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 cadenas ligeras como pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etcétera) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas en tanto que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otro (usualmente humano) para evitar producir una respuesta inmunitaria en esa especie.

40

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se usan de manera indistinta en la presente y se refieren a aquella porción de un antígeno capaz de ser reconocida y unida 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 el plegado terciario de una proteína. Los epítopos formados de aminoácidos contiguos se retienen normalmente en la desnaturalización de la proteína, en tanto que los epítopos formados por el plegado terciario se pierden normalmente en la desnaturalización de la proteína. Un epítipo incluye normalmente al menos 3,

45 50 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 prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de intercalación (ver Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)); EIA de biotina-avidina, directo, de fase sólida (ver Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensayo marcado, directo de fase sólida, ensayo de intercalación, marcado, directo de fase sólida (ver Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa, de fase sólida que usa la marca I-125 (ver Morel et al., *Molec. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)); EIA de biotina-avidina, directo de fase sólida (Cheung et al., *Virology* 176:546-552 (1990)); y RIA marcado, directo (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)). Normalmente, este ensayo comprende el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que tienen cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. Se mide la inhibición competitiva al determinar la cantidad de marca unida a la superficie sólida o a células en la presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos

55 60 65

competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un péptido adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se presente impedimento estérico. Usualmente, cuando está presente un anticuerpo competidor en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común por al menos 50 o 75 %.

5 Que un anticuerpo "se une selectivamente" o "se une específicamente" 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 a un epítipo 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
10 con una KD de al menos aproximadamente 0.1 mM, pero más usualmente al menos aproximadamente 1 μ M. "Se une de manera selectiva" o "se une de manera específica" significa a veces que un anticuerpo se une a una proteína a veces con una KD de al menos aproximadamente 0.1 μ M o mejor, y otras veces al menos aproximadamente 0.01 μ M o mejor. Debido a la identidad de secuencias entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína marcadora de células madre de cáncer en más de
15 una especie.

Como se usa en la presente, los términos "unión no específica" y "unión de fondo" cuando se usan con referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o un péptido se refieren a una interacción que no es dependiente de la presencia de una estructura particular (es decir, el anticuerpo se une a proteínas en general en lugar que una
20 estructura particular tal como un epítipo).

Los términos "aislado" o "purificado" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto
25 desempeño. Una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o un ácido nucleico de la presente descripción que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de cuadros de lectura abiertos que flanquean de forma natural el gen y codifica para proteínas diferentes de la proteína codificada por el gen. Un anticuerpo aislado se separa de otras proteínas no de inmunoglobulina y de otras proteínas de inmunoglobulina con diferente especificidad de unión al antígeno. También
30 puede significar que el ácido nucleico o proteína esté en algunas formas de realización al menos 80 % puro, en algunos formas de realización al menos 85 % puro, en algunas formas de realización al menos 90 % puro, en algunas formas de realización al menos 95 % puro, y en algunas formas de realización al menos 99 % puro.

Como se usa en la presente, el término "cáncer" y "cancerígeno" se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos en la cual una población de células se caracteriza por crecimiento celular de regulación alterada. Los
35 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 pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer
40 ovárico, cáncer hepático, 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 de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

Los términos "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa" se refieren a trastornos asociados con proliferación celular anormal tal como cáncer.
45

"Tumor" y "neoplasma" como se usa en la presente se refieren a cualquier masa de tejido que resulte de crecimiento celular excesivo o proliferación celular excesiva, ya sea benigno (no cancerígeno) o maligno (cancerígeno) incluyendo lesiones pre-cancerígenas.
50

"Metástasis" como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual un cáncer se extiende o transfiere del sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerígena similar en la nueva ubicación. Una célula "metastásica" o "en metástasis" es una que pierde contacto adhesivo con células vecinas y migran mediante la corriente sanguínea o la linfa desde el sitio primario de enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.
55

Los términos "célula madre de cáncer", "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 extensiva; (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 autorrenovación o automantenimiento. Estas propiedades de las "células madre de cáncer", "células madre de tumor" o "células madre de tumor sólido" confieren a estas células madre de cáncer la capacidad de formar tumores palpables en el trasplante en serie en un ratón inmunocomprometido en comparación a la mayoría de tumores sólidos que fallan para formar tumores. Las células madre de cáncer sufren autorrenovación versus diferenciación de una manera caótica para formar tumores con tipos celulares anormales que pueden cambiar durante el tiempo conforme se presenten mutaciones. Las células madre de tumor sólido difieren de la "línea de células madre de cáncer" proporcionada por la patente de Estados Unidos número 6.004.528. En esta patente, la
65

- "línea de células madre de cáncer" se define como un tipo de células progenitoras que crecen lentamente que por sí mismas tienen pocas mutaciones pero que sufren divisiones celulares simétricas en lugar de asimétricas como resultado de cambios tumorigénicos que se presentan en el ambiente de la célula. Esta hipótesis de la "línea de células madre de cáncer" propone, de esta manera, que las células tumorales en proliferación rápida altamente mutadas surgen en su mayor parte como resultado de un ambiente anormal, lo que provoca que las células madre relativamente normales se acumulen y entonces sufran mutaciones que les provocan llegar a ser células tumorales. La patente de Estados Unidos número 6.004.528 propone que este modelo se pueda usar para mejorar la diagnosis de cáncer. El modelo de células madre de tumor sólido es fundamentalmente diferente del modelo de "línea de células madre de cáncer" y como resultado exhibe utilidades no ofrecidas por el modelo de "línea de células madre de cáncer". Primero, las células madre de tumor sólido no están "mutacionalmente reservadas". La "línea de células madre de cáncer mutacionalmente reservadas" descrita por la patente de Estados Unidos número 6.004.528 se puede considerar una lesión pre-cancerígena, en tanto que las células madre de tumor sólido son células de cáncer que pueden contener por sí mismas las mutaciones que son responsables de que la tumorigénesis empiece en la etapa precancerígena hasta el cáncer de etapa tardía. Es decir, las células madre de tumor sólido ("células madre de cáncer") se incluirán entre las células altamente mutadas que se distinguen de la "línea de células madre de cáncer" en la patente de Estados Unidos número 6.004.528. Segundo, las mutaciones genéticas que conducen a cáncer pueden ser en su mayor parte intrínsecas dentro de las células madre de tumor sólido así como ser ambientales. El modelo de células madre de tumor sólido predice que las células madre aisladas de tumor sólido pueden dar origen a tumores adicionales en el trasplante (explicando de esta manera la metástasis) en tanto que el modelo de "línea de células madre de cáncer" predecirá que las células trasplantadas de la "línea de células madre de cáncer" no será capaz de dar origen a un nuevo tumor, puesto que fue su ambiente anormal que fue tumorigénico. En realidad, la capacidad para trasplantar células madre de tumor sólido, humanas, disociadas y fenotípicamente aisladas a ratones (en un ambiente que es muy diferente del ambiente tumoral normal) donde forman aún nuevos tumores distingue la presente divulgación del modelo de "línea de células madre de cáncer". Tercero, las células madre de tumor sólido igualmente se dividen tanto de forma simétrica como de manera asimétrica, tal que la división celular simétrica no es una propiedad obligada. Cuarto, las células madre de tumor sólido pueden dividirse rápidamente o de forma lenta, dependiendo de muchas variables, tal que una lenta velocidad de proliferación no es una característica definitoria.
- Los términos "célula de cáncer", "célula tumoral" y equivalentes gramaticales se refieren a la población total de células derivadas de un tumor o una lesión pre-cancerígena incluyendo tanto células no tumorigénicas, que comprenden el volumen de la población de células tumorales, y las células madre tumorigénicas (células madre de cáncer).
- 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 autorrenovación (que da lugar a células madre adicionales de cáncer, tumorigénicas) y proliferación para generar otras células tumorales (que da origen a células tumorales diferenciadas y de esta manera no tumorigénicas) que permite que las células madre de tumor sólido formen un tumor.
- Como se usa en la presente, los términos "marcadores de cáncer de células madre", "marcadores de células madre de cáncer", "marcadores de células madre de tumor", o "marcadores 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 relacionarse ya sea a una expresión incrementada o disminuida del gen (por ejemplo, niveles incrementados o disminuidos de ARNm o el péptido codificado por el gen).
- 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 cancerígeno. En algunas formas de realización, el tejido de biopsia o fluido de biopsia se obtiene debido a que se sospecha que un sujeto tiene cáncer, y el tejido o fluido de biopsia entonces se examina para la presencia o ausencia de cáncer.
- 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.
- "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas en general reconocidas para el uso en animales, incluyendo humanos.
- "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto de origen.
- "Excipiente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptables" se refiere a un excipiente, portador o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con al menos un anticuerpo de la presente descripción, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra a dosis suficiente para distribuir

una cantidad terapéutica del compuesto.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o portador con el cual se administre al menos un anticuerpo de la presente descripción.

- 5 "Profármaco" se refiere a un derivado de un compuesto terapéuticamente efectivo que requiere una transformación dentro del cuerpo para producir el compuesto terapéuticamente efectivo. Los profármacos pueden ser farmacológicamente inactivos hasta convertirse al compuesto terapéuticamente efectivo de origen.

10 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña, u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño de tumor; inhibir o detener la infiltración de células de cáncer en los órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; 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, reducir la morbilidad y mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de estos efectos. Al grado que el fármaco impide el crecimiento y/o aniquila células existentes de cáncer, se puede referir como citostático y/o citotóxico.

20 Como se usa en la presente, "que proporciona un diagnóstico" o "información de diagnóstico" se refiere a cualquier información, incluyendo por ejemplo la presencia de células madre de cáncer, que es útil en determinar si un paciente tiene una enfermedad o condición y/o en clasificar la enfermedad o condición en una categoría fenotípica o cualquier categoría que tenga significado con respecto al pronóstico de o igualmente a la respuesta a tratamiento (ya sea tratamiento en general o cualquier tratamiento particular) de la enfermedad o condición. De manera similar, diagnóstico se refiere a proporcionar cualquier tipo de información de diagnóstico, incluyendo, pero no limitado a, si un sujeto es probable que tenga una condición (tal como un tumor), si el tumor de un sujeto comprende células madre de cáncer, información relacionada a la naturaleza o clasificación de un tumor como por ejemplo un tumor de alto riesgo o un tumor de bajo riesgo, información relacionada con el pronóstico y/o información útil en seleccionar un tratamiento apropiado. La selección del tratamiento puede incluir la elección de un agente quimioterapéutico particular o de otra forma de realización de tratamiento tal como cirugía o radiación o una elección acerca de si se retiene o libera la terapia.

35 Como se usa en la presente, los términos "que proporciona un pronóstico", "información de pronóstico", o "información predictiva" se refieren a proporcionar información, incluyendo por ejemplo la presencia de células madre de cáncer en el tumor de un sujeto, con respecto al impacto de la presencia de cáncer (por ejemplo, como se determina por los métodos de diagnóstico de la presente divulgación) en la salud futura de un sujeto (por ejemplo, morbilidad o mortalidad esperada, la probabilidad de padecer cáncer, y el riesgo de metástasis).

40 Los términos tal como "que trata" o "tratamiento" o "para tratar" o "que alivia" o "para aliviar" se refieren ambos a 1) medidas terapéuticas que curan, retrasan, disminuyen, los síntomas de, y/o detienen el progreso de una condición o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o desaceleran el desarrollo de una condición o trastorno patológico seleccionado como objetivo. De esta manera, aquéllos en necesidad de tratamiento incluyen aquéllos ya con el trastorno; y aquéllos propensos a tener el trastorno; aquéllos en quienes se va a prevenir el trastorno. Un sujeto "trata" de manera exitosa de acuerdo a los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número de o ausencia completa de células de cáncer; una reducción en el tamaño de tumor; la inhibición de o una ausencia de infiltración de células de cáncer en órganos periféricos que incluye, por ejemplo, la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; la inhibición de una ausencia de metástasis de tumor; la inhibición o una ausencia del crecimiento tumoral; el alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducida; mejora la calidad de vida; o alguna combinación de los efectos.

50 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 ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos base conocidos de ADN y ARN, incluyendo, pero no limitado a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, 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 del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

65 La frase "condiciones de hibridación severa" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su subsecuencia objetivo, normalmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no a otras secuencias. Las

- condiciones severas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a mayores temperaturas. Se encuentra una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acids assays" (1993). En general,
- 5 se seleccionan condiciones severas para que sean aproximadamente 5-10 °C por abajo del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica definida, pH. La T_m es la temperatura (bajo concentración iónica definida, pH, y concentración nucleica) a la cual 50 % de las sondas complementarias al objetivo hibridan a la secuencia objetivo en equilibrio (puesto que las secuencias objetivo están presentes en exceso, a T_m, 50 % de las sondas se ocupan en equilibrio). Las condiciones severas también se pueden lograr con la adición
- 10 de agentes desestabilizantes tal como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo, de manera preferente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación severas de ejemplo pueden ser como sigue: 50 % de formamida, 5 x SSC, y 1 % SDS, incubando a 42 °C, o, 5 x SSC, 1 % SDS incubando a 65 °C, con lavado en 0,2 x SSC, y 0,1 % SDS a 65 °C.
- 15 El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido se puede codificar por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante en tanto que se retengan la actividad deseada o propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión de ligando, transducción de señal, inmunogenicidad, etc.) del fragmento o longitud
- 20 completa. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante tanto en 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 codificante y presentes en el ARNm se refieren como secuencias no traducidas 5'. Las secuencias localizadas 3' o hacia abajo de la región codificante 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 codificante interrumpida con secuencias no codificantes llamadas "intrones" o "regiones de intervención" o "secuencias de intervención". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en el ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tal como intensificadores. Los intrones se remueven o "desempalman" del transcrito nuclear o primario; los intrones por lo
- 25 tanto están ausentes en el transcrito del ARN 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 pueden incluir secuencias localizadas tanto en el extremo 5' como en el 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se refieren como secuencias o regiones de "flanqueo" (estas secuencias de flanqueo están localizadas 5' o 3' a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región de flanqueo 5' puede contener secuencias reguladoras tal como promotores e intensificadores que controlan o tienen influencia en la transcripción del gen. La región de flanqueo 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, escisión post-transcripcional y poliadenilación.
- 30 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 han modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo, la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. 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 se expresan de
- 35 otro modo de forma anormal tal como por ejemplo, expresados como fragmentos que no se presentan de manera natural o variantes de empalme. Por el término "ácido nucleico recombinante" se quiere decir en la presente ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, por la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontradas normalmente en la naturaleza. De esta manera, el enlace operable de diferentes secuencias se logra. 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 están unidas, se consideran ambos recombinantes para los propósitos de esta invención. Se entiende que una vez que se hace un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula huésped u organismo, se replicará de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, estos ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque replicados subsiguientemente de forma no
- 40 recombinante, aún se consideran recombinantes para los propósitos de la invención. De manera similar, una "proteína recombinante" es una proteína hecha usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.
- 45 Como se usa en la presente, el término "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su ambiente natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo a un organismo que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, adicionado en múltiples copias, enlazado a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de genes endógenos ya que las secuencias de genes heterólogos normalmente se unen a secuencias de ADN que no se encuentran de forma natural asociadas con las secuencias génicas en el cromosoma o se asocian con porciones del cromosoma no encontradas en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en locus donde normalmente no se expresa el gen).
- 50
- 55
- 60
- 65

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

5 "Ligación" se refiere al proceso de formar enlaces de fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble hebra. Al menos que se proporcione de otro modo, se puede lograr la ligación usando amortiguadores y condiciones conocidas con 10 unidades de T4-ADN-ligasa ("ligasa") por 0.5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que se ligan. La ligación del ácido nucleico puede servir para enlazar dos proteínas conjuntamente en cuadro para producir una proteína individual, o proteína de fusión.

10 Como se usa en la presente, el término "expresión génica" se refiere al proceso de convertir información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, o ARNsn) a través de la "transcripción" del gen (por ejemplo, mediante la acción enzimática de una ARN-polimerasa), y para los genes que codifican para la proteína, en la proteína a través de la "traducción" del ARNm. Se puede regular la expresión del gen en muchas etapas en el proceso. El "favorecimiento de la expresión" o la "activación" se refieren a la regulación que incrementa la producción de productos de expresión génica (por ejemplo, ARN, o proteína), 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 comprendidas en el favorecimiento de la expresión o en la reducción de la expresión frecuentemente se llaman "activadores" y "represores", respectivamente.

20 Los términos "polipéptido", "péptido", "proteína", y "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 aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácido son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido que se presenta de manera natural, así como a polímeros de aminoácidos que se presentan de manera natural y a polímeros de aminoácidos que no se presentan de manera natural.

30 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos que se presentan de manera natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos 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 posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se presenta de forma natural, por ejemplo, un carbón 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 tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se presenta de forma natural. Los miméticos de aminoácido se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido que se presenta de forma natural.

40 "Variantes conservadoramente modificadas" aplica tanto a secuencias de aminoácidos como secuencias de ácido nucleico. Las "variantes de aminoácido" se refieren a secuencias de aminoácidos. Con respecto a las secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes conservadoramente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican para secuencias idénticas o esencialmente idénticas de aminoácidos, o donde el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas (por ejemplo, naturalmente contiguas). Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para muchas proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. De esta manera, en cada posición donde se especifica 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 ácido nucleico son "variaciones poco notorias", que son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica para un polipéptido también describe variaciones poco notorias del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico "excepto AUG, que ordinariamente es 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 poco notorias de un ácido nucleico que codifican para un polipéptido están implícitas en 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 aminoácido, un experto en la técnica reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que alteran, adicionan o suprimen un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia purificada es una "variante conservadoramente modificada" que incluye donde la alteración da por resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Estas variantes conservadoramente modificadas además de y no excluyente variantes polimórficas, homólogos interespecie y auelos de la divulgación. Las sustituciones normalmente conservadoras incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 65 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)).

El término "marcado con epítipo" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido quimérico que comprende una proteína marcadora de células madre de cáncer, o una secuencia de dominio o porción de la misma, fusionado a una "marca de epítipo". El polipéptido de marca de epítipo comprende suficientes residuos de aminoácido para proporcionar un epítipo para reconocimiento por un anticuerpo, aún es suficientemente corto tal que no interfiere con la actividad de la proteína marcadora de células madre de cáncer. Las marcas de epítipo adecuadas tienen en general al menos seis residuos de aminoácido, usualmente entre aproximadamente 8 a aproximadamente 50 residuos de aminoácido, y a veces entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 residuos. Las marcas comúnmente usadas de epítipos incluyen las marcas Fc, HA, His, y FLAG.

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para estudiar, diagnosticar, caracterizar y tratar cáncer. En particular, la presente divulgación proporciona anticuerpos contra marcadores de células madre de tumores sólidos y métodos para usar esos anticuerpos para inhibir el crecimiento tumoral y para tratar cáncer en pacientes humanos. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos antagonistas que se unen de manera específica a una proteína marcadora de células madre de cáncer e interfieren con, por ejemplo, la unión de ligando, dimerización de receptor, expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer, y/o señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos incluyen anticuerpos agonistas que se unen específicamente a una proteína marcadora de células madre de cáncer y promueve, por ejemplo, la unión de ligando, dimerización de receptor, y/o señalización por una proteína marcadora de células madre de cáncer. En ciertas formas de realización, los anticuerpos descritos no interfieren con o promueven la actividad biológica de una proteína marcadora de células madre de cáncer pero inhiben el crecimiento tumoral, por ejemplo, por internalización y/o reconocimiento por el sistema inmunitario. En ciertas formas de realización, los anticuerpos reconocen de manera específica más de una proteína marcadora de células madre de tumores sólidos.

Se proporciona un anticuerpo aislado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27) y DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde el anticuerpo afecta el crecimiento de un tumor. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona adicionalmente un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o una composición farmacéutica de la presente descripción. En ciertas formas de realización, el anticuerpo se conjuga a una porción citotóxica. En ciertas formas de realización, el método comprende además administrar al menos un agente terapéutico adicional apropiado para efectuar la terapia de combinación. En ciertas formas de realización, las células de tumor se eligen de un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor de próstata, tumor pancreático, y un tumor de cabeza y cuello.

Igual que los tejidos en los cuales se originan, los tumores sólidos consisten de una población heterogénea de células. Que la mayoría de estas células carecen de tumorigenicidad sugiere que el desarrollo y mantenimiento de los tumores sólidos también depende de una pequeña población de células madre (por ejemplo, células tumorigénicas de cáncer) con la capacidad para proliferar y dar origen eficientemente tanto a células madre adicionales de tumor (auto-renovación) y a la mayoría de las células de tumor más diferenciadas que carecen de potencial tumorigénico (es decir, células de cáncer no tumorigénicas). El concepto de células madre de cáncer se introdujo primero brevemente después del descubrimiento de células madre hematopoyéticas (HSC) y se estableció experimentalmente en leucemia mielógena aguda (AML) (Park et al., 1971, J. Natl. Cancer Inst. 46:411-22; Lapidot et al., 1994, Nature 367:645-8; Bonnet & Dick, 1997, Nat. Med. 3:730-7; Hope et al., 2004, Nat. Immunol. 5:738-43). Más recientemente se han aislado células madre de tumores sólidos basándose en su expresión de un patrón único de receptores de superficie celular y en la valoración de sus propiedades de autorrenovación y proliferación en cultivo y en modelos de animal de xenoinjerto. Se descubrió una población ESA+ CD44+ CD24-/linaje bajo mayor que 50 veces enriquecida para la capacidad para formar tumores con relación a células tumorales no fraccionadas (Al-Hajj et al., 2003, Proc. Nat'l, Acad. Sci. 100:3983-8). La capacidad para aislar células madre tumorigénicas de cáncer a partir de la masa de células tumorales no tumorigénicas ha conducido a la identificación de marcadores de células madre de cáncer, genes con expresión diferencial en células madre de cáncer en comparación a células no tumorigénicas de tumor o epitelio normal de mama, usando análisis de micromatriz. La presente divulgación emplea el conocimiento de estos marcadores identificados de células madre de cáncer para diagnosticar y tratar cáncer.

Los marcadores de células madre de cáncer de la presente divulgación se refieren a DLL4 humano, un ligando de receptor de Notch. La ruta de señalización de Notch es uno de varios reguladores críticos de formación de patrón embrionario, mantenimiento de tejido postembrionario, y biología de células madre. De manera más específica, la señalización de Notch está comprendida en el proceso de inhibición lateral entre destinos celulares adyacentes y juega un papel importante en la determinación del destino celular durante divisiones celulares asimétricas. La señalización con la regulación alterada de Notch se asocia con numerosos cánceres humanos donde puede alterar el destino de desarrollo de células de tumor para mantenerlas en un estado indiferenciado 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 la reparación normal de tejido por población de células madre (Beachy et al., 2004, *Nature* 432:324).

5 El receptor de Notch se identificó primero en mutantes de *Drosophila*. La haploinsuficiencia de Notch de *Drosophila* da por resultado muescas en el margen del ala en tanto que la pérdida de función produce un fenotipo "neurogénico" letal embrionario 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 de Notch es un receptor transmembrana de paso único que contiene numerosas repeticiones en tándem tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y repeticiones de Notch/LIN-12 ricas en cisteína dentro de un dominio extracelular grande (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 de Notch de mamífero (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4), y las mutaciones en estos receptores dan por resultado invariablemente 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).

El receptor de Notch se activa por ligandos transmembrana de paso único de la familia Delta, Serrado, Lag-2 (DSL). Los ligandos de Notch conocidos en mamíferos, tipo Delta 1 (DII1), tipo Delta 3 (DII3), tipo Delta 4 (DII4), Dentado 1 y Dentado 2, se caracterizan por un dominio DSL y repeticiones en tándem tipo EGF dentro del dominio extracelular. El dominio extracelular del receptor de Notch interactúa con aquél de sus ligandos, normalmente en células adyacentes, dando por resultado dos escisiones proteolíticas de Notch, una escisión extracelular mediada por una ADAM-proteasa y una escisión dentro del dominio transmembrana mediada por gamma-secretasa. Esta escisión posterior genera el dominio intracelular de Notch (DIGN). El DIGN entonces entra al núcleo donde activa la familia CBF1, Supresor de Pelón [Su(H)], Lag-2 (CSL) de factores de transcripción como los principales efectores en la dirección 3' para incrementar la transcripción de factores de transcripción de hélice-asa-hélice, básicos, nucleares de la familia peludo e intensificador 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). También pueden existir en mamíferos (Martinez et al., 2002, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:524-33), rutas intracelulares alternativas que comprenden la proteína citoplásmica Deltex identificada en *Drosophila*, 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).

Las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) son las células madre mejor entendidas en el cuerpo, y la señalización de Notch está implicada tanto 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 estomal dentro de la médula ósea de adulto. Estas células se caracterizan tanto por un perfil único de expresión génica así como por una capacidad para dar origen de forma continua a células progenitoras más diferenciadas para reconstituir el sistema hematopoyético completo. La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en las HSC y células progenitoras establece líneas de células inmortalizadas que generan tanto células linfoides como mieloides *in vitro* y en ensayos de reconstitución a largo plazo (Varnum-Finney et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1278-81), y la presencia de Dentado 1 incrementa el injerto 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 la señalización de Notch en las HSC *in vivo* y mostró estar comprendida en la división de la diferenciación de las HSC. Adicionalmente, la señalización de Notch parece ser requerida para la auto-renovación de las HSC mediada por Wnt (Duncan et al., 2005, *Nat. Immunol.* 6:314).

La ruta de señalización de Notch también juega un papel central en el mantenimiento de células madre neurales y está implicada tanto en su mantenimiento normal así como en cánceres de cerebro (Kopper & Hadju, 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 origen a todas las células neurales y gliales en el sistema nervioso de los mamíferos durante el desarrollo, y más recientemente se han identificado en el cerebro de adulto (Gage, 2000, *Science* 287:1433-8). Ratones deficientes de Notch1; los genes objetivo de Notch *Hes1*, 3 y 5; y un regulador de la señalización de Notch, *presenilina1* (PS1) muestran números disminuidos de células madre neurales embrionarias. Adicionalmente, se reducen las células madre neurales de adulto en los cerebros de ratones heterocigotos 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 prematura en neuronas (Hatakeyama et al., 2004, *Dev.* 131:5539-50) sugiriendo que la señalización de Notch regula la diferenciación y autorrenovación de las células madre neurales.

La señalización anormal de Notch está implicada en varios cánceres humanos. El gen de NOTCH1 en humanos se identificó primero en un subconjunto de leucemias linfoblásticas agudas de células T como un locus translocado que da por resultado la activación de la ruta de Notch (Ellisen et al., 1991, *Cell* 66:649-61). La activación constitutiva de la señalización de 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). Recientemente, se ha encontrado que las mutaciones, inserciones y supresiones puntuales de NOTCH1 que producen señalización anormal de NOTCH1

están frecuentemente presentes tanto en leucemia linfoblástica aguda/linfoma de células T de niños y adultos (Pear & Aster, 2004, *Curr. Opin. Hematol.* 11:416-33).

5 La inserción frecuente del virus de tumor mamario de ratón tanto en el locus Notch1 y Notch4 en tumores mamarios
 y los resultantes fragmentos activados de proteína Notch implicó primero la señalización de Notch en el cáncer de
 mama (Gallahan & Callahan, 1987, *J. Virol.* 61:66-74; Brennan & Brown, 2003, *Breast Cancer Res.* 5:69; Politi et al.,
 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Estudios adicionales en ratones transgénicos han confirmado un papel para
 10 Notch en la ramificación ductal durante el desarrollo normal de la glándula mamaria, y una forma constitutivamente
 activa de Notch4 en células epiteliales mamarias que 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.*
 15 *Biol.* 196:204-17; Politi et al., 2004, *Semin. Cancer Biol.* 14:341-7). Actualmente, la evidencia de un papel de Notch
 en cáncer de mama humano se limita a la expresión de receptores de Notch en carcinomas de mama y su
 correlación con el resultado clínico (Weijzen et al., 2002, *Nat. Med.* 8:979-86; Parr et al., 2004, *Int. J. Mol. Med.*
 14:779-86). Adicionalmente, se ha observado la sobreexpresión de la ruta de Notch en cánceres cervicales
 (Zagouras et al., 1995, *PNAS* 92:6414-8), carcinoma de células renales (Rae et al., 2000, *Int. J. Cancer* 88:726-32),
 carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Leethanakul et al., 2000, *Oncogene* 19:3220-4), cánceres
 20 endometriales (Suzuki et al., 2004, *Int. J. Oncol.* 17:1131-9), y neuroblastomas (van Limpt et al., 2000, *Med. Pediatr.*
Oncol. 35:554-8) indicativo de un papel potencial de Notch en el desarrollo de varios neoplasmas. De manera
 interesante, la señalización de Notch puede jugar un papel en el mantenimiento del estado indiferenciado de células
 neoplásicas mutantes de Apc del colon (van Es & Clevers, 2005, *Trends Mol. Med.* 11:496-502).

25 La ruta de Notch también está comprendida en múltiples aspectos del desarrollo vascular que incluyen proliferación,
 migración, diferenciación de músculo liso, angiogénesis y diferenciación arterial-venosa (Iso et al., 2003, *Arterioscler.*
Thromb. Vasc. Biol. 23:543). Por ejemplo, las mutaciones nulas homocigotas en Notch-1/4 y Dentado-1 así como
 pérdida heterocigota de Dll4 da por resultado varios defectos aunque variables en el desarrollo arterial y
 vascularización del saco vitelino. Adicionalmente, los embriones de ratones hipomórficos de Notch 2 deficientes de
 30 Dll1 muestran hemorragia que probablemente resulta de un desarrollo pobre de estructuras vasculares (Gale et al.,
 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs et al., 2000, *Genes Dev.* 14:1343-52; Xue et al., 1999, *Hum. Mol. Genet.* 8:723-30;
 Hrabe de Angelis et al., 1997, *Nature* 386:717-21; McCright et al., 2001, *Dev.* 128:491-502). En humanos, las
 mutaciones en DENTADO1 se asocian con 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).

35 La identificación de DLL4 como se expresa en células madre de cáncer en comparación a epitelio normal de mama
 sugiere la selección como objetivo de la ruta de Notch para eliminar no solo la mayoría de las células no
 tumorigénicas de cáncer, sino también las células tumorigénicas responsables de la formación y reincidencia de
 tumores sólidos. Adicionalmente, debido al papel prominente de la angiogénesis en la formación y mantenimiento de
 40 tumores, la selección como objetivo de la ruta de Notch mediante anticuerpos contra DLL4 también puede inhibir de
 manera efectiva la angiogénesis, privando a un cáncer de nutrientes y contribuyendo a su eliminación.

De esta manera, la presente divulgación proporciona un marcador de células madre de cáncer, la expresión del cual
 se puede analizar para diagnosticar o monitorizar una enfermedad asociada con cáncer. En algunas formas de
 45 realización, la expresión de un marcador de células madre de cáncer se determina por la expresión de
 polinucleótidos tal como, por ejemplo, ARNm que codifica para el marcador de células madre de cáncer. El
 polinucleótido se puede detectar y cuantificar por cualquiera de varios medios bien conocidos por aquellos expertos
 en la técnica. En algunas formas de realización, el ARNm que codifica para un marcador de células madre de cáncer
 se detecta por hibridación *in situ* de secciones de tejido de, por ejemplo, una biopsia de paciente. En algunas formas
 50 de realización, se aísla ARN de un tejido y se detecta por ejemplo por transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, o
 micromatrices. Por ejemplo, se puede extraer el ARN total de una muestra de tejido y los cebadores que hibridan y
 amplifican de manera específica un marcador de células madre de cáncer se puede usar para detectar la expresión
 de un polinucleótido de marcador de células madre de cáncer usando RT-PCR.

En ciertas formas de realización, la expresión de un marcador de células madre de cáncer se puede determinar por
 55 detección del polipéptido correspondiente. El polipéptido se puede detectar y cuantificar por cualquiera de varios
 medios bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. En algunas formas de realización, un polipéptido de
 marcador de células madre de cáncer se detecta usando métodos bioquímicos analíticos tal como por ejemplo,
 electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) o cromatografía de capa
 60 delgada (TLC). El polipéptido aislada también se puede secuenciar de manera a técnica normales. En algunas
 formas de realización, se detecta una proteína marcadora de células madre de cáncer con anticuerpos formulados
 contra la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica en secciones de tejido. De
 manera alternativa, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer puede detectar la expresión
 usando, por ejemplo, ELISA, FACS, transferencia Western, inmunoprecipitación o micromatrices de proteína. Por
 65 ejemplo, se pueden aislar células madre de cáncer de una biopsia de paciente y se detecta la expresión de una
 proteína marcadora de células madre de cáncer con anticuerpos fluorescentemente marcados usando FACS. En
 otro método, las células que expresan un marcador de células madre de cáncer se pueden detectar *in vivo* usando

anticuerpos marcados en un sistema típico de formación de imágenes. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con isótopos paramagnéticos se pueden usar para formación de imágenes por resonancia magnética (RM).

5 En algunas formas de realización de la presente divulgación, un ensayo de diagnóstico comprende determinar la expresión o no de un marcador de células madre de cáncer en células de tumor usando, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación in situ, o RT-PCR. En otras formas de realización, un ensayo de diagnóstico comprende determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer usando, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa. En algunas formas de realización, un ensayo de diagnóstico comprende además determinar los niveles de expresión de un marcador de células madre de cáncer en comparación a un tejido de control tal como
10 por ejemplo, epitelio normal.

La detección de la expresión de un marcador de células madre de cáncer entonces se puede usar para proporcionar un pronóstico y seleccionar una terapia. Un pronóstico se puede basar en lo que indique cualquier expresión conocida de riesgo de un marcador de células madre de cáncer. Adicionalmente, se puede usar la detección de un
15 marcador de células madre de cáncer para seleccionar una terapia apropiada que incluye, por ejemplo, tratamiento con anticuerpos contra la proteína marcadora, detectada, de células madre de cáncer. En ciertas formas de realización, el anticuerpo se une de manera específica al dominio extracelular de una proteína marcadora de células madre de cáncer tal como el ligando de receptor de Notch, DLL4.

20 En el contexto de la presente divulgación, un anticuerpo adecuado es un agente que puede tener uno o más de los siguientes efectos, por ejemplo: interferir con la expresión de un marcador de células madre de cáncer; interferir con la activación de una ruta de traducción de señales de células madre de cáncer, por ejemplo al inhibir estéricamente interacciones entre un marcador de células madre de cáncer y su ligando, receptor o co-receptores; activar una ruta de traducción de señales de células madre de cáncer, por ejemplo al actuar como un ligando o al promover la unión
25 de un ligando endógeno; o unión a un marcador de células madre de cáncer y al inhibir la proliferación de células tumorales.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer actúan de manera extracelular para modular la función de una proteína marcadora de células madre de cáncer. En algunas formas de
30 realización, la unión extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede inhibir la señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer, por ejemplo al inhibir la activación intrínseca (por ejemplo, la actividad de cinasa) de un marcador de células madre de cáncer y/o al inhibir estéricamente la interacción, por ejemplo, de un marcador de células madre de cáncer con su ligando, con su receptor, con un co-receptor, o con la matriz extracelular. En algunas formas de realización, la unión extracelular de un anticuerpo contra
35 un marcador de células madre de cáncer puede reducir la expresión en superficie celular de un marcador de células madre de cáncer tal como por ejemplo, por internalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer o al disminuir el tráfico de superficie celular de un marcador de células madre de cáncer. En algunas formas de realización, la unión extracelular de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer puede promover la señalización de una proteína marcadora de células madre de cáncer por ejemplo al actuar como un ligando de señuelo o al incrementar la unión a ligando.
40

En ciertas formas de realización, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer se unen a una proteína marcadora de células madre de cáncer y tienen uno o más de los siguientes efectos: inhiben la proliferación de células de tumor, activan la muerte celular de células de tumor, promueven la diferenciación de células de tumor
45 en un tipo celular menos tumorigénico, o impiden la metástasis de las células de tumor. En ciertas formas de realización, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer activan la muerte celular mediante una toxina conjugada, agente quimioterapéutico, radioisótopo, u otro agente. Por ejemplo, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se conjuga a una toxina que se activa en células de tumor que expresan el marcador de células madre de cáncer por internalización de proteína.
50

En ciertas formas de realización, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer media la muerte celular de una célula que expresa la proteína marcadora de células madre de cáncer mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). La CCDA 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
55 ejemplo, tienen receptores de Fc y pueden mediar la citólisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497).

En ciertas formas de realización, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer activan la muerte celular de una célula que expresa una proteína marcadora de células madre de cáncer al activar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). La CDC comprende la unión del complemento del 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 a
60 la membrana celular y la eventual muerte celular. Se conoce que la actividad biológica de los anticuerpos se determina, en un mayor grado, por los dominios constantes o región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananieu y Benacerraf, Textbook of Immunology, 2ª Edición, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases difieren a este respecto, de modo que los anticuerpos de la misma subclase, pero de diferente especie. De los anticuerpos humanos, la IgM es la clase más eficiente de anticuerpos para unión a complemento,
65 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 divulgación, se preparan anticuerpos de estas clases que tienen la actividad biológica deseada.

5 Se puede valorar la capacidad de cualquier anticuerpo particular contra una célula madre de cáncer para mediar la lisis de la célula objetivo por activación de complemento y/o CCDA. Las células de interés se cultivan y marcan *in vitro*; se adiciona el anticuerpo al cultivo celular en combinación con ya sea complemento de suero o células inmunitarias que se pueden activar por los 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 los anticuerpos usando el propio suero del paciente como una fuente de células inmunitarias y/o complemento. El anticuerpo que es capaz de activar el complemento o mediar la CCDA en la prueba *in vitro* entonces se puede usar terapéuticamente en ese paciente particular.

15 En ciertas formas de realización, los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer pueden activar la muerte celular inhibiendo la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir 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 respuesta a la ovulación. El crecimiento de tumores sólidos mayores de 1-2 mm² también requiere la angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno sin que mueran las células tumorales. En ciertas formas de realización, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer selecciona como objetivo las células vasculares que expresan el marcador de células madre de cáncer que incluye, por ejemplo, células endoteliales, células de músculo liso, o componentes de la matriz extracelular requeridos para el montaje vascular. En ciertas formas de realización, un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer inhibe la señalización del factor de crecimiento requerida por el reclutamiento, montaje, mantenimiento o supervivencia de células vasculares.

25 Los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer encuentran uso en los métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en la presente. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación se usan para detectar la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer en muestras biológicas tal como por ejemplo, una biopsia de tejido del paciente, efusión pleural, o muestra sanguínea. Las biopsias de tejido se pueden seccionar y se puede detectar la proteína usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Además, se pueden aislar células individuales de una muestra, y la expresión de la proteína se detecta en células fijas o vivas por análisis de FACS. En ciertas formas de realización, se pueden usar anticuerpos en arreglos de proteína para detectar la expresión de un marcador de células madre de cáncer, por ejemplo, en células de tumor, en lisados celulares, o en otras muestras de proteína. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales al poner en contacto los anticuerpos con células tumorales en ensayos basados en células *in vitro*, modelos de animales *in vivo*, etc. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se usan para tratar cáncer en un paciente al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer.

40 Los anticuerpos de la divulgación se pueden preparar por cualquier medio convencional conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos policlonales al inmunizar un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, mono, etc.) por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.), opcionalmente conjugado a hemocianina de lapa (KLH), albúmina de suero, etc., diluido en soporte 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 formula, y el suero se decanta, se clarifica por centrifugación, y se valora para el título del anticuerpo. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar de suero o ascitis de acuerdo a métodos normales conocidos en la técnica que incluye cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

50 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma, tal como aquellos descritos por Kohler y Milestein (1975) Nature 256:495. Usando el método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza como se describe anteriormente para provocar la producción por linfocitos de anticuerpos que se unirán de manera específica a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también 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 linfocitos no fusionados y 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* (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA); ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA)) entonces se pueden propagar ya sea por cultivo *in vitro* usando métodos normales (Goding, Monoclonal Antibodies: 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 anteriormente para los anticuerpos policlonales.

65 De manera alternativa, también se pueden elaborar anticuerpos monoclonales usando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente de Estados Unidos número 4.816.576. Los polinucleótidos que

codifican para un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, tal como por RT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos que amplifican de manera específica 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 pesada y ligera entonces se clonan en vectores adecuados de expresión, que cuando se transfectan en células huésped tal como células de *E. coli*, células COS simiescas, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células huésped. También, los anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada se pueden aislar de bibliotecas de visualización en fago que expresan CDR de la especie deseada como se describe (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).

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 formas de realización, 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) para un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas formas de realización, las regiones constantes se truncan o remueven para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Se puede usar la mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

En algunas formas de realización de la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal contra un marcador de células madre de cáncer es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) dentro de las regiones variables. Estos anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas de HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se administran a un sujeto humano. En la práctica, normalmente los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos con un mínimo de secuencias no humanas. 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.

Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando varias técnicas bien conocidas. Un anticuerpo se puede humanizar al sustituir las CDR de un anticuerpo humano con aquéllas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.), que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas siguiendo los métodos de (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536). El anticuerpo humanizado se puede modificar adicionalmente por la sustitución del residuo adicional ya sea en la región marco, humana, variable y/o dentro de los residuos no humanos reflejados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

La elección de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera humana que se van a usar en la elaboración de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo al método de "mejor ajuste", la secuencia de dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina contra la biblioteca completa de secuencias conocidas de aminoácidos de dominio variable humano. De esta manera, en ciertas formas de realización, la secuencia de aminoácidos, humana, que es más homóloga a aquélla del anticuerpo de roedor del cual se toman las CDR se usa como la región marco, humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., 1993, J. Immunol., 151:2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol., 196:901). Otro método usa una FR particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas y se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., 1992, PNAS, 89; 4285; Presta et al., 1993, J. Immunol., 151:2623). En ciertas formas de realización, se usa una combinación de métodos para recolectar la FR variable humana para uso en la generación de anticuerpos humanizados.

Adicionalmente, se entiende que los anticuerpos (por ejemplo, de roedor) que se van a humanizar deben retener alta afinidad para el antígeno así como otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, se pueden preparar anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de la secuencia parental del anticuerpo de roedor que se va a humanizar y las varias secuencias humanizantes candidatas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Se pueden usar programas de computadora para ilustrar y presentar probables estructuras tridimensionales, conformacionales de secuencias seleccionadas de anticuerpos candidatos. El uso de estos modelos permite el análisis del probable papel de los residuos en la función del anticuerpo que se va a humanizar, es decir, el análisis de los residuos que tienen influencia en la capacidad del anticuerpo candidato para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar residuos de FR y combinar al anticuerpo de origen al anticuerpo humanizado receptor de modo que se logren las características deseadas del anticuerpo. En general, los residuos en las CDR de la región de determinación de antígeno (o región hipervariable) se retienen del anticuerpo parental (por ejemplo, el anticuerpo de roedor con las propiedades deseadas de unión a antígeno) en el anticuerpo humanizado para la unión a antígeno. En ciertas formas de realización, al menos un residuo adicional dentro de la FR variable se retiene del anticuerpo parental en el anticuerpo humanizado. En ciertas formas de realización, se retienen hasta seis residuos adicionales dentro de la FR variable del anticuerpo parental en el anticuerpo humanizado.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de inmunoglobulina se designan Hx y Lx, respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido de acuerdo al esquema de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1987, 1991. Kabat lista muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subgrupo, y lista el aminoácido que se presenta más comúnmente para cada posición de residuo en ese subgrupo para generar una secuencia de consenso. Kabat usa un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia listada, y este método para asignar números de residuo ha llegado a ser estándar en el campo. El esquema de Kabat es extendible a otros anticuerpos no incluidos en su compendio al alinear el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. El uso del sistema de numeración de Kabat identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición de L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a una posición L50 de aminoácido de un anticuerpo de ratón. Además, se pueden alinear de forma única cualesquiera secuencias de anticuerpo, por ejemplo para determinar el por ciento de identidad, al usar el sistema de numeración de Kabat de modo que cada aminoácido en una secuencia de anticuerpos se alinea con el aminoácido en la otra secuencia que tiene el mismo número de Kabat. Después de la alineación, si se están comparando una región de anticuerpo (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre el sujeto y las regiones del anticuerpo de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en el sujeto como en la región de anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con las separaciones no contadas, multiplicado por 100 para convertir a porcentaje.

El Ejemplo 1 posterior describe la producción de anticuerpos anti-DLL4 humanizados de ejemplo que se unen de manera específica a DLL4 humano, un marcador de células madre de cáncer de la presente descripción (21M18 H9L2, ATCC depósito número PTA-8427 y 21M18 H7L2, ATCC depósito número PTA-8425, depositado el 10 de mayo de 2007). En ciertas formas de realización, los anticuerpos humanizados comprenden regiones no humanas de determinación de antígeno derivadas del anticuerpo monoclonal murino 21M18. De manera específica, en ciertas formas de realización, una o más de las CDR de cadena pesada del anticuerpo parental de roedor CDR1 (SEC ID N°: 1), CDR2 (SEC ID N°: 2; SEC ID N°: 3; o SEC ID N°: 4, que varían en la posición de Kabat 52a), y CDR3 (SEC ID N°: 5) se retienen en el anticuerpo 21M18 humanizado. En ciertas formas de realización, una o más de las CDR de cadena ligera del anticuerpo parental de roedor, CDR1 (SEC ID N°: 9, CDR2 (SEC ID N°: 10), y CDR3 (SEC ID N°: 11), se retienen en el anticuerpo 21M18 humanizado. En ciertas formas de realización, los anticuerpos humanizados comprenden adicionalmente al menos una sustitución de FR dentro de ya sea la región variable humana de cadena pesada o ligera.

En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27) y DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde el anticuerpo afecta el crecimiento de un tumor. En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de IgG intacto. En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de IgG2 intacto. En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado es un fragmento de anticuerpo. En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado es un fragmento de Fab.

En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado de la presente divulgación comprende una región variable (VH) de cadena pesada que comprende una región de determinación de antígeno no humana y una región marco, variable, humana. En ciertas formas de realización, la región de determinación de antígeno no humana comprende regiones de determinación de complementariedad (CDR) de origen de roedor. En ciertas formas de realización, la región de determinación de antígeno no humana comprende CDR de un anticuerpo de ratón. En ciertas formas de realización, las CDR de roedor se derivan del anticuerpo 21M18 monoclonal, en donde 21M18 comprende una región variable de cadena pesada designada SEC ID N°: 6. En ciertas formas de realización, en donde el anticuerpo humanizado comprende una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de (a) CDR1 (SEC ID N°: 1), CDR2 (SEC ID N°: 2; SEC ID N°: 3; o SEC ID N°: 4), y CDR3 (SEC ID N°: 5); o (b) SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, o SEC ID N°: 8.

En ciertas formas de realización, la región marco, variable, de cadena pesada, humana comprende secuencias humanas expresadas. En ciertas formas de realización, está sustituido al menos un residuo en la región marco, variable, humana. En ciertas formas de realización, al menos un residuo en la región marco, variable, de cadena pesada, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 16, 20, 27, 28, 38 y 48 basado en el sistema de numeración de Kabat. En ciertas formas de realización, las posiciones 16, 20, 27, 28, 38 y 48 están sustituidas basado en el sistema de numeración de Kabat. En ciertas formas de realización, al menos un residuo en la región marco, variable, humana está sustituida con un residuo que ocupa la posición correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

En ciertas formas de realización, la región marco, variable, de cadena pesada, humana comprende IGH(V)1-18. En ciertas formas de realización, está sustituido al menos un residuo en la región marco, variable, humana. En ciertas formas de realización, al menos un residuo en la región marco, variable, de cadena pesada, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 20H, 28H, 38H, 48H, y 69H basado en el sistema de numeración de

Kabat. En ciertas formas de realización, están sustituidas las posiciones 20H, 28H, 38H, 48H, y 69H basado en el sistema de numeración de Kabat. En ciertas formas de realización, al menos un residuo en la región marco, variable, humana está sustituido con un residuo que ocupa la posición correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

5 En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado de la presente divulgación comprende una región variable (VL) de cadena ligera que comprende una región de determinación de antígeno, no humana, y una región marco, variable, humana. En ciertas formas de realización, la región de determinación de antígeno, no humana, comprende las CDR de origen de roedor. En ciertas formas de realización, la región de determinación de antígeno, no humana comprende las CDR de un anticuerpo de ratón. En ciertas formas de realización, las CDR se derivan del anticuerpo monoclonal 21M18, en donde 21M18 comprende una región VL designada SEC ID N°: 12. En ciertas formas de realización, la región VL comprende una secuencia de aminoácidos de (a) CDR1 (SEC ID N°: 9), CDR2 (SEC ID N°: 10); o CDR3 (SEC ID N°: 11); o (b) SEC ID N°: 12.

15 En ciertas formas de realización, la región marco, variable, de cadena ligera, humana comprende IGK(V)4-1. En ciertas formas de realización, se sustituye al menos un residuo en la región marco, variable, de cadena ligera, humana. En ciertas formas de realización, al menos un residuo en la región marco, variable, humana está en una posición seleccionada del grupo que consiste de 22L y 36L basado en el sistema de numeración de Kabat. En ciertas formas de realización, las posiciones 22L y 36L se sustituyen basado en el sistema de numeración de Kabat.

20 En ciertas formas de realización, al menos un residuo de la región marco, variable, humana se sustituye con un residuo que ocupa la posición correspondiente en un anticuerpo que comprende la región de determinación de antígeno, no humana.

25 En ciertas formas de realización, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo que compite con el anticuerpo 21M18 para unión específica a DLL4 humano, en donde el anticuerpo 21M18 comprende: (a) una cadena pesada con una región variable designada SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, o SEC ID N°: 8; y (b) una cadena ligera con una región variable designada SEC ID N°: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

30 En ciertas formas de realización, el anticuerpo humanizado que se une específicamente a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27) y el dominio DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, o SEC ID N°: 8 y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 12. En algunas formas de realización, la región variable de cadena pesada tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, o SEC ID N°: 8 y la región variable de cadena ligera tiene al menos 95 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 12. En algunas formas de realización, la región variable de cadena pesada tiene al menos 99 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, o SEC ID N°: 8 y la región variable de cadena ligera tiene al menos 99 % de identidad de secuencia a SEC ID N°: 12.

40 En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27), y DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una región de determinación de antígeno, no humana, que codifica para CDR1 (SEC ID N°: 1); CDR2 (SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, o SEC ID N°: 4), y CDR3 (SEC ID N°: 5) y una región marco, variable, humana que codifica para IGH(V)1-18. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27) y DSL humana (SEC ID N°: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de: (a) una molécula de polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, o SEC ID N°: 8; y (b) una molécula de polinucleótido que hibrida al complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27), y DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de (a) SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, o SEC ID N°: 15; y (b) una molécula de polinucleótido que hibrida el complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa.

60 En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27), y DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde el anticuerpo comprende una región VL que comprende una región de determinación de antígeno, no humana, que codifica para CDR1 (SEC ID N°: 9); CDR2 (SEC ID N°: 10); y CDR3 (SEC ID N°: 11) y una región marco, variable, humana que codifica para IGK(V)4-1. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de

manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27) y DSL humana (SEC ID N°: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de: (a) una molécula de polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12 y (b) una molécula de polinucleótido que hibrida al complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa. En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona una molécula aislada de polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado que se une de manera específica a un epítipo de DLL4 humano formado por una combinación de la región N-terminal de DLL4 humano (SEC ID N°: 27), y DSL humano (SEC ID N°: 26), en donde la molécula de polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de (a) SEC ID N°: 16 y (b) una molécula de polinucleótido que hibrida el complemento de la molécula de polinucleótido de acuerdo a (a) bajo condiciones de hibridación severa.

En ciertas formas de realización, se proporciona un vector de expresión que comprende una molécula aislada de polinucleótido de la presente divulgación. En ciertas formas de realización, se proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende una molécula aislada de polinucleótido de la presente divulgación.

En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo humanizado de la presente descripción. En ciertas formas de realización, el cáncer comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata, o cáncer de cabeza y cuello.

En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo humanizado de la presente descripción, y comprende además una inserción de paquete que indica que la composición se puede usar para tratar cáncer.

Además, se pueden preparar directamente anticuerpos completamente 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., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-94; y la patente de Estados Unidos número 5.750.373). También, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca de fagos, en donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar en ratones transgénicos que contienen locus de inmunoglobulinas humanas que son capaces, en la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Este planteamiento se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016.

Esta divulgación también abarca anticuerpos biespecíficos que reconocen de manera específica un marcador de células madre de cáncer. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente a al menos dos epítopos diferentes. Los epítopos diferentes pueden estar ya sea dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido de marcador de células madre de cáncer) o en diferentes moléculas tal que por ejemplo, los anticuerpos puedan tanto reconocer de manera específica como unirse a un marcador de células madre de cáncer así como, por ejemplo, 1) una molécula efectora en un leucocito tal como un receptor de células T (por ejemplo, CD3) o receptor de Fc (por ejemplo, CD64, CD32, o CD16) o 2) un agente citotóxico como se describe en detalle más adelante. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos diferentes epítopos, al menos uno de los cuales se origina en un polipéptido de la divulgación. De manera alternativa, se puede combinar un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina 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 el 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 a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Se conocen técnicas para elaborar anticuerpos biespecíficos (Millstein et al., 1993, 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 la patente de Estados Unidos número 5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos (Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)).

En ciertas formas de realización, se proporciona un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, para incrementar la penetración en el tumor. 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; Brennan et al., 1985, Science, 229:81). En ciertas formas de realización, se producen recombinantemente fragmentos de anticuerpo. Se pueden expresar todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, y scFv en y segregar a partir de *E. coli* u otras células huésped, permitiendo de esta manera la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Estos fragmentos de anticuerpo también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo también pueden ser anticuerpos lineales como se describe en la patente de Estados Unidos número 5.641.870, por ejemplo, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Para el experto en la técnica serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo.
- De acuerdo a la presente divulgación, se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena individual específicos para un polipéptido de la divulgación (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos número 4.946.778). Además, se pueden adaptar métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con especificidad deseada para el ligando de receptor de Notch, DLL4, o derivados, fragmentos, u homólogos del mismo. Se pueden producir fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos a un polipéptido de la divulgación, por técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a: (a) un fragmento F(ab')₂ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.
- Adicionalmente, 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, por incorporación de un epítipo de unión a receptor de salvamento en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o al incorporar el epítipo en una marca de péptido que entonces se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte intermedia (por ejemplo, por síntesis peptídica o ADN).
- Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente unidos. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células indeseadas (patente de Estados Unidos número 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluyendo aquellos que comprenden agentes de reticulación. 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.
- Para los propósitos de la presente divulgación, se debe apreciar que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con los polipéptido de DLL4 humano. A este respecto, la región variable puede comprender o se deriva de cualquier tipo de mamífero que se pueda inducir para montar una respuesta humoral y 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 formas de realización, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras formas de realización, las regiones variables de anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente no humana) se pueden manejar o adaptar de manera específica para mejorar las propiedades de unión o para reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, se pueden humanizar regiones variables útiles en la presente divulgación o se pueden alterar de otro modo a través de la inclusión de secuencias importadas de aminoácidos.
- 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 reemplazo parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o aún subclase como el anticuerpo del cual se derivan las regiones marco, se contempla que las CDR se derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y de manera preferente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, solo puede ser necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de los Estados Unidos números 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la técnica, ya sea al llevar a cabo experimentación de rutina o por prueba de ensayo y error como obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.
- No obstante las alteraciones de la región variable, aquellos expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos modificados de esta divulgación comprenderán anticuerpos, o fragmentos inmunorreactivos de los mismos, en los cuales al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han suprimido o alterado de otro modo para proporcionar características bioquímicas deseadas tal como localización incrementada de tumor o vida media reducida en suero en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. En algunas formas de realización, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones en la región constante

compatibles con esta divulgación 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 de cadena ligera (CL). En algunas formas de realización de la divulgación, se contemplan regiones constantes modificadas en donde se suprimen parcial o completamente uno o más dominios. En algunas formas de realización, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes suprimidas de dominio en donde el dominio CH2 completo se ha removido (construcciones Δ CH2). En algunas formas de realización, el dominio omitido de región constante se reemplazará por un separador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular impartida normalmente 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 activa el sistema de complemento. La activación de complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación de complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar comprendida en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Adicionalmente, 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 eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares activa varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen el engullido y destrucción de partículas revestidas con anticuerpo, depuración de complejos inmunitarios, lisis de células objetivo revestidas con anticuerpo por células aniquiladoras (llamada citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, o CCDA), delegación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina. Aunque se han estudiado en cierto grado varios receptores de Fc y sitios de receptores, aún hay mucho que se desconoce acerca de su ubicación, estructura y funcionamiento.

En tanto que no se limita el alcance de la presente divulgación, se cree que los anticuerpos que comprenden regiones constantes modificadas como se describe en la presente proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan 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 de Fc del anticuerpo modificado en circulación, incrementando de este modo la localización de tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de región constante, consistentes con esta divulgación, moderen la unión de complemento y reduzcan de este modo 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 oligosacáridos que permitan la localización mejorada debido a especificidad incrementada de antígeno o flexibilidad incrementada de anticuerpo. De manera similar, se pueden hacer fácilmente modificaciones a la región constante de acuerdo con esta divulgación usando técnicas de ingeniería molecular o bioquímica bien conocidas, dentro del alcance del experto en la técnica.

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

Además de la supresión de los dominios enteros de región constante, se apreciará que los anticuerpos de la presente divulgación se pueden proporcionar por la supresión o sustitución parcial de unos pocos aminoácidos o aún un solo aminoácido. 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 de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión a CLQ de complemento) que se va a modular. Estas supresiones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) en tanto que dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el presente dominio de región constante. Además, como se sugiere anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos se pueden modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos 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 se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Ciertas formas de realización pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar características deseables tal como función efectora o proporcionar más unión a carbohidratos o citotoxina. En estas formas de realización, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios seleccionados de región constante.

La presente divulgación abarca adicionalmente variantes equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, expuestos en la presente. Por ejemplo, éstos pueden contener mutaciones de sustituciones conservadoras, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general tal como por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, o 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 divulgación también se refiere a inmunos conjugados que comprenden un anticuerpo conjugado o un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen los agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores de crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), isótopos radioactivos (por ejemplo, radioconjugados), etc. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de estos inmunos conjugados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricino, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. En algunas formas de realización, los anticuerpos se pueden conjugar a radioisótopos tal como ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, y ¹⁸⁸Re usando cualquiera de varios quelantes bien conocidos o marcación directa. En otras formas de realización, las composiciones descritas pueden comprender anticuerpos acoplados a fármacos, profármacos o linfocinas tal como interferón. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se elaboran usando varios agentes de acoplamiento a proteína, bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-pirididitiol)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoéster (tal como dimetil-adipimidato-HCL), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los conjugados de un anticuerpo o una o más toxinas de molécula pequeña, tal como una caliqueamicina, maitansinósidos, un tricoteno, y CC1065, y derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se pueden usar. En algunas formas de realización, 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 a una célula efectora tal como una célula T.

Con independencia de la forma de obtención de las cantidades útiles, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar en cualquiera de varias formas conjugadas (es decir, un inmunos conjugado) o no conjugado. De manera alternativa, los anticuerpos de esta divulgación se pueden usar en una forma no conjugada o "descubierta" para aparejar los mecanismos de defensa natural del sujeto incluyendo la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) para eliminar las células malignas. La selección de qué anticuerpo conjugado o no conjugado, modificado usar dependerá del tipo y etapa de cáncer, uso del tratamiento adjunto (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y la condición del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica puede hacer fácilmente esta selección en vista de las enseñanzas en la presente.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden valorar para unión inmunospecífica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunos ensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tal como análisis BIAcore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímico, transferencias Western, radioinmunos ensayos, ELISA, inmunos ensayos de "intercalación", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunos ensayos fluorescentes, e inmunos ensayos de proteína A. Estos ensayos son rutina y bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

En algunas formas de realización, la inmunos especificidad de un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se determina usando ELISA. Un ensayo de ELISA comprende preparar antígeno, revestir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer conjugado a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer no se conjuga a un compuesto detectable, sino en cambio se añade al pocillo un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer. En algunas formas de realización, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se puede revestir el pocillo y se puede añadir un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno al pocillo revestido. Un experto en la técnica podrá reconocer los parámetros que se pueden modificar para incrementar la

señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York at 11.2.1).

5 La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno de marcador de células madre de cáncer y la constante de disociación de una 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, con 3H o 125I), o fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en la presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado seguido por la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer y las constantes de disociación de la unión se pueden determinar de los datos por análisis en gráfica scatchard. En algunas formas de realización, se usa el análisis cinético de BIAcore para determinar las constantes de asociación y disociación de la unión de los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer. El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación de los anticuerpos de chips con antígenos inmovilizados de marcador de células madre de cáncer en su superficie.

15 En ciertas formas de realización, la divulgación abarca polinucleótidos aislados que codifican para un polipéptido que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra DLL4 humano. De esta manera, el término "polinucleótido que codifica para un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye solo secuencias codificantes para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes, adicionales. Los polinucleótidos de la divulgación pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN. ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético; y puede ser de doble hebra o de hebra individual, y si es de hebra individual puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (anti-sentido).

25 La presente divulgación se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente que codifican, por ejemplo, para fragmentos, análogos y derivados. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica que se presenta de forma natural de polinucleótido o una variante que no se presenta de forma natural del polinucleótido. En ciertas formas de realización, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica que se presenta de manera natural de la secuencia codificante de los polipéptidos descritos. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alterna de una secuencia de polinucleótido que tiene, por ejemplo, una sustitución, supresión o adición de uno o más nucleótidos, que no alteran sustancialmente la función del polipéptido codificado.

35 En ciertas formas de realización, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionado al mismo cuadro de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped (por ejemplo, una secuencia guía que funciona como una secuencia secretoria para controlar el transporte de un polipéptido de las células. El polipéptido que tiene una secuencia guía es una preproteína y puede tener la secuencia guía escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para una preproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácido 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una preproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia, permanece una proteína madura activa.

45 En ciertas formas de realización, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionado en el mismo cuadro de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. 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 huésped bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una marca de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína de hemaglutinina de influenza cuando se usa un huésped de mamífero (por ejemplo, células COS-7).

50 En ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, y en algunas formas de realización, al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un polinucleótido que codifica para un anticuerpo que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra DLL4 humano.

55 Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia se propone que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden presentarse en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia donde quiera entre estas posiciones terminales, interpuestas ya sea de manera individual entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como una materia práctica, si cualquier molécula particular de ácido nucleico es al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, y en algunas formas de realización, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de referencia se puede determinar de manera convencional usando programas conocidos de computadora tal como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo a la presente divulgación, los parámetros se ajustan tal que el porcentaje de identidad se calcula sobre longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y que se permiten separaciones en la homología de hasta 5 % del número total en nucleótidos en la secuencia de referencia.

Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, en las regiones no codificantes, o en ambas. En algunas formas de realización, las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones poco notorias, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas formas de realización, las variantes de nucleótidos se producen por sustituciones poco notorias 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 huésped particular (cambiar codones en el ARNm humano a aquellos preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, un fragmento del mismo, contra DLL4 humano. Se reconocerá en la técnica que se pueden variar algunas secuencias de aminoácido de la divulgación sin efecto significativo de la estructura o función de la proteína. De esta manera, la divulgación incluye adicionalmente variaciones de los polipéptidos que muestran actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra proteína de DLL4 humano. Estos mutantes incluyen supresiones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo.

Los polipéptidos y análogos se pueden modificar adicionalmente para contener porciones químicas adicionales normalmente no parte de la proteína. Estas porciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, vida media biológica o absorción de la proteína. Las porciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto lateral deseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una revisión de estas porciones en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Los polipéptidos aislados descritos en la presente se pueden producir por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Estos métodos varían desde métodos de síntesis directa de proteínas a construcción de una secuencia de ADN que codifica para secuencias aisladas de polipéptido y que expresan aquellas secuencias en un huésped transformado, adecuado. En algunas formas de realización, una secuencia de ADN se construye usando tecnología recombinante al aislar o sintetizar una secuencia de ADN que codifica para una proteína tipo silvestre de interés. Opcionalmente, la secuencia se puede mutagenizar por mutagénesis específica de sitio para proporcionar análogos funcionales de la misma. Ver, por ejemplo, Zoeller et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 81:5662-5066 (1984) y la patente de Estados Unidos número 4.588.585.

En algunas formas de realización, se construirá una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido de interés por síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos se pueden diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos de polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que se favorecen en la célula huésped en la cual se producirá el polipéptido recombinante de interés. 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 de 5' o 3' para montaje de complementariedad.

Una vez montadas (por síntesis, por mutagénesis dirigida al sitio o por otro método), las secuencias de polinucleótido que codifican para un polipéptido aislado particular de interés e 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 huésped deseado. Se puede confirmar el montaje apropiado por secuenciación de nucleótidos, por mapeo de restricción, y por la expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, a fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen se debe enlazar de manera operativa a secuencias de control de expresión traduccional y transcripcional que son funcionales en el huésped elegido de expresión.

Se usan vectores de expresión recombinante para amplificar y expresar ADN que codifica para fusiones de polipéptido de marcador de células madre de cáncer. Los vectores de expresión recombinante son construcciones replicables de ADN que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican para una fusión de

polipéptido de marcador de células madre de cáncer o un análogo bioequivalente enlazado de manera operativa a elementos reguladores traduccionales o transcripcionales adecuados derivados de genes mamíferos, microbianos, virales o de insecto. Una unidad trascricional comprende en general un montaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o intensificadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en el ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de terminación e iniciación de transcripción y traducción, como se describe en detalle más adelante. Estos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Se puede incorporar adicionalmente la capacidad para replicarse en un huésped, usualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes. Se enlazan de forma operativa regiones de ADN que se relacionan funcionalmente entre si. Por ejemplo, se enlaza de manera operativa ADN para un péptido de señal (guía secretora) al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la selección del polipéptido; se enlaza de manera operativa un promotor a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o se enlaza de manera operativa un sitio de unión a ribosoma a una secuencia codificante si se coloca para permitir la traducción. En general, medios operativamente enlazados contiguos y en el caso de guías secretorias medios contiguos y en cuadro de lectura. Los elementos estructurales incluidos para el uso en los sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia guía que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. De manera alternativa, donde la proteína recombinante se expresa sin una secuencia guía o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. 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 del vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Se pueden emplear una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucarióticos, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus de papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores útiles de expresión para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tal como plásmidos de *Escherichia coli*, incluyendo pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de intervalo más amplio de huéspedes, tal como M13 y fagos filamentosos de ADN de hebra individual.

Las células huésped adecuadas para la expresión de una proteína marcadora de células madre de cáncer, incluye procariotas, levadura, células eucariotas de insecto o superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe más adelante. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células. Los vectores apropiados de clonación y expresión para el uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, 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 de insecto o de mamífero para expresar la proteína recombinante. La expresión de las 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 completamente funcionales. Los ejemplos de líneas de células huésped mamíferas adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (*Cell* 23:175, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado, que incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3 de ovario de hámster Chino (CHO), líneas de células HeLa y BHK. Los vectores de expresión mamífera 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 otras secuencias no transcritas de flanco 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitios necesarios de unión a ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios de donador y aceptador de empalme, y secuencias de terminación transcripcional. Los sistemas de Baculovirus para producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988).

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

Por ejemplo, primero se pueden concentrar sobrenadantes de los sistemas que segregan proteína recombinante en medio de cultivo usando un filtro comercialmente disponible de concentración de proteína, 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 enfriar una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede emplear un paso de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos 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) que emplean medio hidrófobo de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes u otros grupos 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

5 proteína recombinante homogénea.

Se puede aislar proteína recombinante producida en cultivo bacteriano, por ejemplo, por extracción inicial de sedimentos celulares, seguido por una o más concentraciones, saladura, pasos de cromatografía de exclusión de tamaño de intercambio iónico, acuoso. Se puede emplear cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) para

10 pasos finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden romper por cualquier método conveniente, incluyendo ciclo de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonido, rompimiento mecánico, o el uso de agentes de lisis.

La presente divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un

15 marcador de células madre de cáncer usando los anticuerpos contra un marcador de células madre de cáncer descrito en la presente. En ciertas formas de realización, el método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer *in vitro*. Por ejemplo, se cultiva una línea de células

20 inmortalizadas o una línea de células de cáncer que expresan un marcador de células madre de cáncer en medio al cual se adiciona un anticuerpo contra el marcador expresado de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento celular. En algunas formas de realización, se aíslan células de tumor que comprenden células madre de tumor a partir de una muestra de paciente tal como por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural, o muestra sanguínea y se cultivan en un medio al cual se adiciona un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento celular.

25 En algunas formas de realización, el método para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas que expresan un marcador de células madre de cáncer comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer *in vivo*. En ciertas formas de realización, la puesta en contacto de una célula tumorigénica con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se emprende en un modelo de

30 animal. Por ejemplo, se cultivan xenoinjertos que expresan un marcador de células madre de cáncer en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) que se administran con un anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento tumoral. En algunas formas de realización las células madre de cáncer que expresan un marcador de células madre de cáncer se aíslan de una muestra de paciente tal como por ejemplo una biopsia de tejido, efusión pleural, muestra sanguínea y se inyectan en ratones inmunocomprometidos

35 que entonces se administran con un anticuerpo contra el marcador de células madre de cáncer para inhibir el crecimiento de células tumorales. En algunas formas de realización, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se administra al mismo tiempo o brevemente después de la introducción de células tumorigénicas en el animal para impedir el crecimiento tumoral. En algunas formas de realización, el anticuerpo contra un marcador de células madre de cáncer se administra como un producto terapéutico después de que se han cultivado las células tumorigénicas hasta un tamaño especificado.

La presente divulgación proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos que seleccionan como objetivo un marcador de células madre de cáncer. Estas composiciones farmacéuticas encuentran

45 uso al inhibir el crecimiento de células tumorales y al tratar cáncer en pacientes humanos.

Se preparan formulaciones para almacenamiento y uso al combinar un anticuerpo purificado de la presente divulgación con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, portador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos adecuados farmacéuticamente

50 aceptables incluyen, pero no se limitan a, amortiguadores no tóxicos tal como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tal como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; 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 (por ejemplo, de menos de 10 residuos de aminoácido); proteínas tal como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como

55 polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o glicina; carbohidratos tal como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y agentes tensioactivos no iónicos tal como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

60 La composición farmacéutica de la presente divulgación se puede administrar de cualquier número de maneras para tratamiento ya sea local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas mucosas incluyendo distribución vaginal y rectal) tal como 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

65 incluyendo infusión o inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en la forma de dosis unitaria. Estas formulaciones incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, 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 dicálcico o gomas, y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. La composición de pre-formulación sólida 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 de la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una composición inerte cubierta por un componente exterior. Adicionalmente, los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interior pase intacto a través del estómago o que se retrase en la liberación. Se pueden usar varios materiales tal como capas o revestimientos entéricos, que son materiales que incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con estos materiales tal como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las composiciones farmacéuticas incluyen anticuerpos de la presente divulgación vueltos complejos con liposomas (Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; y Patentes de los Estados Unidos número 4.485.045 y 4.544.545). Se describen liposomas con tiempo mejorado de circulación en la Patente de Estados Unidos número 5.013.556. Se pueden generar algunos liposomas por evaporación de fase inversa con una composición de lípido que comprende una fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño definido de poro para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los anticuerpos también se pueden atrapar en microcápsulas. Estas microcápsulas se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de distribución de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a 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 contienen 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), poliláctidos (Patente de Estados Unidos número 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 TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), acetato-isobutirato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico.

En algunas formas de realización, el tratamiento comprende la administración combinada de un anticuerpo de la presente divulgación en agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un anticuerpo puede presentarse antes de, concurrente con, o subsiguiente a la administración de quimioterapias. Las quimioterapias contempladas por la divulgación 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, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino. La administración combinada puede incluir coadministración ya sea en una formulación farmacéutica individual o usando formulaciones separadas, o administración consecutiva en cualquier orden pero en general dentro de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos puedan exceder simultáneamente sus actividades biológicas. La preparación y programas de dosificación para estos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes o como se determine empíricamente por el practicante experto. La preparación y programas de dosificación para estas quimioterapias también se describe en Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

En ciertas formas de realización de la divulgación, el tratamiento comprende la administración combinada de un anticuerpo de la presente divulgación y un segundo agente terapéutico. Como se usa en la presente, "un segundo agente terapéutico" incluye, pero no se limita a, agente quimioterapéutico, terapias de radiación, citocina y anticuerpo contra otro antígeno asociado a tumor.

En otras formas de realización, el tratamiento comprende la administración combinada de un anticuerpo de la presente divulgación y terapia de radiación. El tratamiento con el anticuerpo puede ocurrir antes de, concurrente con, o subsiguiente a la administración de la terapia de radiación. Se puede usar cualquier programa de dosificación para esta terapia de radiación como se determine por el practicante experto.

En otras formas de realización, el tratamiento puede comprender la administración combinada de anticuerpos de la presente divulgación 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) (ErbtuxMR), el receptor de erbB2 (HER2) (HerceptinMR), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (AvastinMR). Adicionalmente, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citocinas, y se puede lograr por remoción quirúrgica de células de cáncer o cualquier otra terapia juzgada necesaria por un facultativo que trata.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la presente divulgación depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, de la severidad y curso de la enfermedad, de la sensibilidad de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente, y demás todo a discreción del facultativo que trata. El anticuerpo se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una curación o se logre una disminución del estado de enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Se pueden calcular programas óptimos de dosificación a partir de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo individual. El facultativo que administra puede determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías de dosificación y proporciones de repetición. En general, la dosis es de 0.01 μ a 100 mg por kg de peso corporal, y se puede dar una vez o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente. El facultativo que trata puede estimar las proporciones de repetición para la dosificación basándose en los tiempos medidos de residencia y a las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales.

La presente divulgación proporciona kits que comprenden los anticuerpos descritos en la presente y que se pueden usar para realizar los métodos descritos en la presente. En ciertas formas de realización, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado contra un marcador de células madre de cáncer en uno o más recipientes. En algunas formas de realización, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de resultados. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos descritos de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos establecidos de kit que son bien conocidos en la técnica.

Las formas de realización de la presente divulgación se pueden definir adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que describen en detalle la preparación de anticuerpos de la presente descripción y métodos para usar los anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden practicar muchas modificaciones, tanto a los materiales como a los métodos, sin apartarse del alcance de la presente descripción. Dondequiera que sea posible, los mismos números de referencia se usarán a todo lo largo de las figuras para referirse a las mismas o similares partes. Como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “o” y “el” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “un anticuerpo” incluye una pluralidad de estos anticuerpos o uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la técnica. Adicionalmente, todos los números que expresen cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, pureza, o polipéptido de longitudes de polinucleótido, y demás, usados en la especificación, se modifican por el término “aproximadamente” a menos que se indique de otro modo. Por consiguiente, los parámetros numéricos expuestos en la especificación y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos monoclonales y humanizados frente a DLL4

Producción de antígenos

Se generó un fragmento de polipéptido recombinante del dominio extracelular de DLL4 humano como un antígeno para la producción de anticuerpos. Se usó tecnología normal de ADN recombinante para aislar a un polinucleótido que codifica para los aminoácidos 1-522 de DLL4 (SEC ID N°: 25). Este polinucleótido se ligó en cuadro N-terminal a ya sea una Fc-marca humana o histidina-marca y se clonó en un vector de plásmido de transferencia para expresión mediada por baculovirus en células de insecto. Se usaron protocolos de normales de transfección, infección y cultivo celular para producir células recombinantes de insecto que expresan el correspondiente polipéptido de DLL4 (O'Reilly et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)).

La escisión de la secuencia de señal endógena de DLL4 humano se aproximó usando software de predicción de escisión SignalP 3.0, sin embargo, el punto real de escisión *in vivo* puede diferir por un par de aminoácidos en cualquier dirección. La escisión prevista de DLL4 está entre los aminoácidos 1 y 26, de esta manera la proteína de antígeno de DLL4 comprende aproximadamente el aminoácido 27 hasta el aminoácido 522. Se purificó la proteína de antígeno de medio acondicionado con células de insecto usando cromatografía de afinidad de Ni⁺⁺-quelato y Proteína A. entonces se dializó la proteína purificada de antígeno contra PBS (pH=7), se concentró a aproximadamente 1 mg/ml, y se filtró estéril en la preparación para inmunización.

Inmunización

5 Se inmunizaron ratones (n=3) con proteína purificada de antígeno de DLL4 (Antibody Solutions, Mountain View, CA) usando técnicas normales. Se examinó la sangre de ratones individuales aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial para reconocimiento de antígenos usando análisis de ELISA y FACS (descritos en detalle más adelante). Los dos animales con los títulos más altos de anticuerpo se seleccionaron para refuerzo final con antígeno después de lo cual se aislaron células de bazo para la producción de hibridomas. Las células de hibridoma se colocaron en placas de 96 pocillos a 1 célula por pocillo, y el sobrenadante de cada pocillo se examinó por análisis de ELISA y FACS contra la proteína de antígeno. Se seleccionaron varios hibridomas con el título alto de anticuerpos y se aumentaron en escala en cultivo estático en matraz. Se purificaron los anticuerpos del sobrenadante de hibridoma usando cromatografía de proteína A o proteína G-agarosa. Nuevamente se probaron los anticuerpos monoclonales purificados por FACS y se isotipificaron para seleccionar los anticuerpos de IgG e IgM.

15 Análisis mediante FACS

Para seleccionar anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, se usaron clones que reconocen la proteína de DLL4 de superficie celular, nativa, por análisis FACS. Se co-transfectaron células HEK293 con vectores de expresión que codifican para el clon de ADNc de longitud completa de DLL4 y el marcador de transfección, GFP. Veinticuatro o cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se recolectaron en suspensión y se incubaron en hielo con anticuerpos anti-DLL4 o IgG de control para detectar la unión de anticuerpo de fondo. Las células se lavaron y los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a un cromóforo fluorescente. Entonces se clasificaron las células marcadas por FACS para identificar anticuerpos anti-DLL4 que reconocen de manera específica la expresión en la superficie celular de la proteína DLL4 de superficie celular nativa. Los anticuerpos monoclonales 21M14 y 21M18 reconocieron la DLL4 en células transfectadas (Figura 1). El anticuerpo murino 21M18 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Nº X).

Entonces, se determinó, usando citometría de flujo la capacidad de los anticuerpos dirigidos hacia DLL4 para interferir con la interacción entre DLL4 y Notch. Se incubaron células HEK293 establemente transducidas con ADNc de DLL4 con ya sea Notch1-EGF10-15-Fc o proteína-Fc de control en la presencia de anticuerpos de control o anti-DLL4. Se detectó la unión de las proteínas de fusión de Fc a células que expresan DLL4 por anticuerpo anti-Fc de cabra conjugados a PE y citometría de flujo. Entonces se determinó, por una disminución en la intensidad de fluorescencia la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para inhibir la unión de Notch a DLL4. Como se muestra en la Figura 2A, se observó inhibición de la unión de Notch con los anticuerpos murinos 21M14 y 21M18, pero no 21M12. Adicionalmente, 21M18 murino se usa de manera específica a DLL4 humano pero no murino, y bloquea la unión de DLL4 humano pero no DLL4 murino que se une a células que expresan Notch 1 (Figura 2B). Estos datos indican que 21M18 en experimentos de xenoinjerto seleccionan como objetivo DLL4 humano expresado en las células tumorales y no el DLL4 murino expresado en la vasculatura.

40 Mapeo de epítomos

Para identificar los anticuerpos que reconocen regiones específicas del dominio extracelular de DLL4, se realizó el mapeo de epítomos. Se generaron, usando tecnología normal de ADN recombinante, vectores de plásmidos de expresión de mamífero que comprenden un promotor de CMV en la dirección 5' de los polipéptidos que codifican para una serie anidada de fragmentos de supresión del dominio extravascular de DLL4 fusionado a proteínas de Fc. También se generaron, usando tecnología normal de ADN recombinante construcciones adicionales que codificaron para fragmentos de DLL4 que fueron quimeras de DLL4 humano y de ratón fusionado a la proteína de Fc. Se diseñó una serie adicional de proteínas de fusión de DLL4-Fc que incluyeron sustituciones específicas de aminoácidos. Estas proteínas de fusión recombinante se expresaron en células HEK 293 transitoriamente transfectadas de las cuales se recolectó medio acondicionado veinticuatro a veintiocho horas después de la transfección por ELISA. Los fragmentos de proteína de fusión de DLL4 se capturaron en placas revestidas con anticuerpos anti-Fc humana. Entonces se dejaron que los anticuerpos anti-DLL4 interactúen con los fragmentos de DLL4 unidos y se midió la unión por incubación subsiguiente con anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP y detección de la actividad de HRP (Figura 3A). Como se muestra en la Figura 3A, los anticuerpos murinos monoclonales 21M14 y 21M18 reconocen el epítipo contenido dentro de los aminoácidos 1-217 de DLL4. Esta región contiene un motivo llamado el dominio "DSL (Delta/Serrado/lag-2)" presente en varios ligandos de Notch (Tax et al., 1994, Nature 368:150-4). Adicionalmente, se examinaron varios anticuerpos monoclonales anti-DLL4 para la unión a fragmentos de proteína de fusión de DLL4 por análisis de transferencia western (Figura 3B). Este trabajo demuestra la unión específica humana de 21M18 a DLL4 con los aminoácidos 1-154 en la presencia de un dominio DSL presente dentro de los aminoácidos 155-217. Esto demuestra una importancia anteriormente inapreciada de esta secuencia N-terminal de la función de DLL4. Este trabajo se resume en forma esquemática (Figura 3C) con las unión de 21M18 o carencia de unión denotada por "+" o "-", respectivamente. La unión de 21M18 se caracterizó adicionalmente por examen de la unión de 21M18 a una serie de fragmentos de proteína de DLL4 (DLL4dom1-6) que contiene sustituciones específicas de aminoácidos que cambian los aminoácidos de DLL4 humano por los correspondientes aminoácidos murinos. Estas proteínas de fusión se examinaron para la unión a 21M18 por ELISA. Se identificaron varias posiciones como importantes para la unión de 21M18 como se muestra (Figura 3D). 21M18 presenta unión

degradada a fragmentos de proteína de DLL4 con sustituciones en los aminoácidos 68, 69 y 71 (reemplazo de valina, valina y prolina) o en los aminoácidos 142 y 144 (reemplazo de lisina y alanina). En contraste, un anticuerpo distinto 21M21 se une a un epítipo contenido dentro de la región de DSL (Figura 3E), pero este anticuerpo no impacta la función de DLL4 como se muestra en la Figura 6, demostrando que la unión de DSL no predice un anticuerpo funcional.

Anticuerpos quiméricos

Después de que se identifican anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente DLL4, estos anticuerpos se modifican para superar la respuesta inmunitaria de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) cuando se usan anticuerpos de roedor como agentes terapéuticos. En ciertas formas de realización, las regiones variables de la cadena pesada de cadena ligera del anticuerpo monoclonal seleccionado por RT-PCR a partir de células de hibridoma y se ligan en cuadro a regiones constantes de cadena 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 humano tal como TCAE 5.3 que contiene los genes de región constante de cadena ligera kappa y cadena pesada de IgG₁ humana en el mismo plásmido (Preston et al., 1998, *Infection & Immunity* 66:4137-42). Entonces se co-transfectan vectores de expresión que codifican para cadenas pesada y ligera quiméricas en células de ovario de hámster Chino (CHO) para producción de anticuerpos quiméricos. La inmunorreactividad y la afinidad de los anticuerpos quiméricos se comparan a anticuerpos murinos parentales por ELISA y FACS.

Anticuerpos humanizados

En ciertas formas de realización, se generan anticuerpos humanizados contra DLL4. Los dominios variables del anticuerpo monoclonal murino 21M18 se aislaron y se secuenciaron a partir de la línea de hibridoma usando PCR degenerada esencialmente como se describe en Larrick J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1250 y Jones, S.T. & Bending, M. M., 1991, *Bio/Technology* 9:88. Entonces se eligieron regiones marco, variables, de cadena pesada y ligera, humanas que igualmente son estructuralmente similares a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 21M18 parental como las regiones marco, humanas para humanización. Para identificar las regiones marco, humanas, candidatas, las secuencias de proteína previstas codificadas por los dominios variables murinos VH y VL de 21M18 se comparan con secuencias de anticuerpo, humanas codificadas por ADNc humano expresado usando búsquedas BLAST para secuencia humana depositadas en Genbank. Usando este método, se seleccionan secuencias de ADNc, humanas, expresadas (por ejemplo genbank AY393019, DC295533) para análisis adicional al diseñar un soporte de cadena pesada.

Las diferencias de aminoácidos entre cadenas pesadas, de soporte, humanizadas, candidatas y la cadena pesada del anticuerpo 21M18 monoclonal murino de origen se evalúan para importancia probable, y un juicio hecho con respecto a si cada diferencia en la posición contribuye al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. Este análisis se guía por el examen de estructuras cristalinas resueltas de otros fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, la estructura de Fab 2E8 como se describe en Trakhanov et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28). Se modelan estructuras usando software de computadora que incluye Jmol, quick PDB, y Pymol. Se da consideración al impacto potencial de un aminoácido en una posición determinada en el empaque del soporte de la β -hoja, la interacción entre los dominios variables de cadena pesada y ligera, el grado de exposición a solvente de la cadena lateral de aminoácidos, y la probabilidad que un aminoácido impactara la colocación de las asas de CDR. De este análisis, se sintetizaron químicamente cinco cadenas de VH candidatas fusionadas en cuadro a la región constantes de IgG2 humana. Las cadenas pesadas candidatas comprenden: i) de un soporte humano funcional que contiene sustituciones seleccionadas dentro de la región marco, sintética basada en el análisis de impacto probable en la función de unión de 21M18 y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 1, 2 y 5).

De manera similar, se identifican diferencias de aminoácidos entre una cadena ligera de IGK(V)4-1 de soporte, humana, seleccionada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino 21M18 de origen, y entonces se hace juicio, con respecto a si cada diferencia en la posición contribuye al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. De este análisis, se sintetizan químicamente cinco cadenas de VL candidatas. La primera cadena ligera candidata comprende: i) soporte humano de IGK(V)4-1 completo y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 de origen (SEQ ID Nos. 9, 10 y 11). Las cuatro cadenas ligeras candidatas adicionales comprenden: i) la región marco humana de IGK(V)4-1 con un número creciente de residuos murinos de 21M18 retenidos en la región marco y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 de origen (SEQ ID Nos: 9, 10 y 11).

La funcionalidad de cada cadena pesada y ligera humanizada, variante, candidata se prueba por co-transformación en células mamíferas. Cada una de las cinco cadenas pesadas de 21M18, humanizadas, candidatas descritas anteriormente se co-transfectan con el ADNc de cadena ligera de 21M18 murino en células HEK, y se valora el medio acondicionado para la actividad de unión al antígeno DLL4 por ELISA. La variante de la cadena pesada de 21M18 que exhibe la unión más fuerte se selecciona. Esta variante "21M18 H2" contiene, además de las CDR murinas, sustituciones en 6 posiciones de soporte dentro del soporte de Vh, posiciones de Kabat, 16, 20, 27, 28, 38 y 48 (Figura 4A). La cadena pesada humanizada 21M18 H2 entonces se co-transfecta con cada una de la 5 cinco cadenas ligeras humanizadas candidatas en células HEK293, y entonces se valora el medio acondicionado para la unión a antígeno por ELISA. Una variante de cadena ligera individual se encuentra que exhibe mejor unión que los

otros candidatos, "21M18 L2", que retiene residuos murinos en las posiciones de Kabat 22 y 36 (Figura 5).

Entonces, se altera el residuo aislado de cisteína en CDR2 H2 (SEC ID N°: 2). De manera específica, se sintetizan dos variantes de cadena pesada de H2 con el residuo de cisteína en la posición de Kabat 52a modificado a un residuo de serina (variante H7; SEC ID N°: 3) o valina (variante H9; SEC ID N°: 4). Estas cadenas pesadas se co-transfectan en células HEK293 con L2, y medio acondicionado nuevamente valorado. Ambas variantes (21M18 H7L2 y 21M18 H9L2) demuestran unión específica a antígeno por ELISA. De esta manera las CDR 2 de cadena pesada de 21M18 comprende SEQ ID Nos: 2, 3 o 4 en las cuales el residuo en la posición de Kabat 52a comprende un residuo de cisteína, serina o valina.

En ciertas formas de realización, se generaron anticuerpos humanizados contra DLL4. Los dominios variables del anticuerpo monoclonal murino 21M18 se aislaron y se secuenciaron de la línea de hibridoma usando PCR degenerada esencialmente como se describe en Larrick J.M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 1250 y Jones, S.T. & Bending, M.M., 1991, *Bio/Technology* 9:88. Las regiones marco, variables de cadena pesada y ligera, humanas más similares a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 21M18 parentales entonces se eligieron como las regiones marco, humanas para humanización. Para identificar las regiones marco, humanas, más similares, las secuencias de proteína previstas codificadas por los dominios variables murinos de VH y VL de 21M18 se compararon con dominios variables de Ig codificados por el genoma humano usando búsquedas de BLAST para secuencia genómica humana depositada en Genbank. Usando este método, se eligió IGH(V)1-18 como la región marco, de cadena pesada, humana y se eligió IGK(V)4-1 como la región marco, de cadena ligera, humana.

Las diferencias de aminoácidos entre la cadena pesada de IGH(V)1-18 de soporte, humana, seleccionada y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 21M18 parental se identificaron, y entonces se hizo un juicio con respecto a si cada diferencia en la posición contribuyó al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. Este análisis se guió por el examen de estructuras cristalinas resueltas de otros fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, la estructura de Fab 2E8 como se describe en Trakhanov et al, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28). Las estructuras se modelaron usando software de computadora que incluye Jmol, quick PDB, y Pymol. Se dio consideración al impacto potencial de un aminoácido en una posición determinada en el paquete del soporte de la β -hoja, la interacción entre los dominios variables de cadena pesada y ligera, el grado de exposición a solvente de la cadena lateral de aminoácidos, y la probabilidad que un aminoácido impactara la colocación de las asas de CDR. De este análisis, se sintetizaron químicamente cinco cadenas de VH candidatas fusionadas en cuadro a la región constante de IgG2 humana. La primera cadena pesada candidata comprendió: i) un soporte humano de IGH(V)1-18 completo y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 1, 2 y 5). Las cuatro cadenas pesadas candidatas adicionales comprendieron: i) la región marco, humana de IGH(V)1-18 con un número creciente de residuos murinos de 21M18 retenidos en la región marco y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 1, 2 y 5).

De manera similar, se identificaron diferencias de aminoácidos entre la cadena ligera de IGK(V)4-1 de soporte, humana, seleccionada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino 21M18 de origen, y entonces se hizo un juicio con respecto a si cada diferencia en la posición contribuyó al plegado apropiado del anticuerpo 21M18. De este análisis, se sintetizaron químicamente cinco cadenas de VL candidatas. La primera cadena ligera candidata comprendió: i) un soporte humano de IGK(V)4-1 completo y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos. 9, 10 y 11). Las cuatro cadenas ligeras candidatas adicionales comprendieron: i) la región marco, humana de IGK(V)4-1 con un número creciente de residuos murinos de 21M18 retenidos en la región marco y ii) la CDR del anticuerpo murino 21M18 parental (SEQ ID Nos: 9, 10 y 11).

Mediante co-transfección en células mamíferas se robó la funcionalidad de cada cadena pesada y ligera, humanizada, variante, candidata. Cada una de las cinco cadenas pesadas de 21M18, humanizadas, candidatas descritas anteriormente se co-transfectó con el ADNc de cadena ligera de 21M18 murino en células HEK293, y entonces se valoró el medio acondicionado para la actividad de unión al antígeno de DLL4 por ELISA. Se seleccionó la variante de cadena pesada de 21M18 que exhibe la unión más fuerte. Esta variante, "21M18 H2" contuvo, además de las CDR murinas, residuos murinos en cinco posiciones de soporte, las posiciones de Kabat 20, 28, 38, 48 y 69 (Figura 4). La cadena pesada humanizada 21M18 H2 entonces se co-transfectó con cada una de las cinco cadenas ligeras humanizadas candidatas en células HEK293, y nuevamente se valoró el medio acondicionado para la unión al antígeno por ELISA. Se encontró que variante de cadena ligera individual exhibe mejor unión que los otros candidatos, "21M18 L2", que retiene los residuos murinos en las posiciones de Kabat 22, 36 (Figura 5).

Entonces, se alteró el residuo aislado de cisteína en CDR2 H2 (SEC ID N°: 2). De manera específica, se sintetizaron dos variantes de cadena pesada de H2 con el residuo de cisteína en la posición de Kabat 52a modificado a un residuo de serina (variante H7; SEC ID N°: 3) o de valina (variante H9; SEC ID N°: 4). Estas cadenas pesadas se co-transfectaron en células HEK293 con L2, y nuevamente se valoró el medio acondicionado. Ambas variantes (21M18 H7L2 y 21M18 H9L2) demostraron unión específica a antígeno por ELISA. De esta manera las CDR 2 de cadena pesada de 21M18 comprende SEQ ID Nos: 2, 3 o 4 en las cuales el residuo en la posición de Kabat 52a es un residuo de cisteína, serina o valina.

Los anticuerpos 21M18 humanizados entonces se caracterizaron adicionalmente. De manera específica, la afinidad de unión de los anticuerpos 21M18 humanizados purificados por cromatografía de proteína A se determinó usando

Biacore. Se determinó la afinidad que es aproximadamente 0.33 nM para la variante H2L2 de 21M18. Los anticuerpos 21M18 humanizado se depositaron con ATCC (21M18 H9L2, ATCC depósito no. PTA-8427 y 21M18 H7L2, ATCC depósito no. PTA-8425, depositados el 10 de mayo de 2007).

5 Anticuerpos humanos

En algunas formas de realización, usando tecnología de visualización en fagos se aislaron anticuerpos humanos que reconocen de manera específica el dominio extracelular de DLL4. Una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contiene dominios variables de anticuerpos humanos se examina para reconocimiento específico y de alta afinidad del antígeno de DLL4 descrito anteriormente. De manera específica, se intercambian casetes de CDR en la biblioteca mediante sitios únicos de restricción de flanqueo por optimización de anticuerpos. Entonces se clonan regiones variables humanas optimizadas en un vector de expresión de Ig que contiene la cadena pesada y cadenas ligera kappa de IgG₁ humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO mamíferas.

15 **Ejemplo 2: Ensayos *in vitro* para evaluar anticuerpos contra DLL4**

Este ejemplo demuestra ensayos *in vitro* representativos para probar la actividad de anticuerpos generados contra DLL4 en proliferación celular, activación de de Notch y citotoxicidad.

20 Ensayo de proliferación

La expresión de DLL4 por diferentes líneas de células de cáncer se cuantifica usando análisis Taqman. Líneas de células identificadas como que expresan DLL4 se colocan en placa a una densidad de 10⁴ células por pocillo en microplacas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se dejan propagare durante 24 horas. De manera subsiguiente, se cultivan células durante 12 horas adicionales en DMEM fresco con FCS al 2 % punto en el cual se adicionan anticuerpos anti-DLL4 versus anticuerpos de control al medio de cultivo en la presencia de 10 μmol/l de BrdU. Después de la marcación con BrdU, se remueve el medio de cultivo, y las células se fijan a temperatura ambiente durante 30 minutos en etanol y se hacen reaccionar durante 90 minutos con anticuerpo anti-BrdU monoclonal conjugado con peroxidasa (clon BMG 6H8, fragmentos Fab). El sustrato se desarrolla en una solución que contiene tetrametilbencidina y se detiene después de 15 minutos con 25 μl de 1 mol/l de H₂SO₄. El color de la reacción se mide con un lector automático de placas de ELISA usando un filtro de 450 nm (UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Todos los experimentos se realizaron en triplicado. Se determina la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para inhibir la proliferación celular en comparación a anticuerpos de control.

35 Ensayo de activación de ruta

En ciertas formas de realización, se determina *in vitro* la capacidad de los anticuerpos contra DLL4 para bloquear la activación de la ruta de señalización de Notch. Se co-transfectaron células HeLa cultivadas en DMEM complementado con antibióticos y FCS al 10 % con 1) vector indicador Hes1-Luc que contiene el promotor Hes1 en la dirección 5' de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir niveles de señalización de Notch (Jarriault et al., 1995, Nature 377:355-8) en respuesta al ligando de DLL4 y 2) indicador de luciferasa de Renilla (Promega, Madison, WI) como un control interno para eficiencia de transfección. Entonces se adicionaron células transfectadas a placas de cultivo revestidas durante la noche con 10 μg/ml de proteína de DLL4-Fc. Entonces se adicionaron anticuerpos a DLL4 al medio de cultivo celular. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se midieron los niveles de luciferasa usando un kit de ensayo dual de luciferasa (Promega, Madison, WI) con la actividad de luciferasa de luciérnaga normalizada a la actividad de luciferasa de Renilla. De esta manera se determinó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la activación de la ruta de Notch inducida por DLL4. Se observó inhibición de la activación de DLL4 de la activación de la ruta de Notch con los anticuerpos 21M14 y 21M18 murinos anti-DLL4 (Figura 6). En contraste, el anticuerpo 21M21 anti-DLL4 no inhibe la unión de Notch (Figura 6) a pesar de la unión al dominio DSL de DLL4 (Figuras 3A-3C).

En ciertas formas de realización, se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para modular la activación génica en la dirección 3'. Se aislaron células de tumor de colon C8 de animales tratados con anticuerpos 21M18 murinos (descritos en detalle más adelante) y se determinó por RT-PCR la expresión de los genes HES1 y ATOH-1 de la ruta de Notch. Se aisló el ARN total del tejido tumoral con el kit de Tejido Fibroso RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad de muestras de ARN por la relación de 260 nm/280 nm. Se determinó la integridad de ARN al correr una alícuota de la muestra de ARN en un gel de agarosa desnaturalizante teñido con bromuro de etidio (EtBr). La relación de ARNr de 28s a 18s se visualizó usando una cámara FluorChem distribuida con el software AphaEasaFC. Se eluyeron muestras de ARN en agua libre de RNasa y se almacenaron a -80 °C. La RT-PCR de tiempo real se hizo con una sondas no extensible fluorescente-dual que contiene el tinte indicador 3'-TAMRAFAM (6-carboxifluoresceína) y un 3'-TAMRA (6-tetrametilrodamina). Se usaron 100 microgramos del ARN total para PCR de tiempo real en un volumen final de 25 uL que contiene transcriptasa inversa, amortiguador Taqman 1X (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la mezcla de sonda/cebador. Se llevaron a cabo reacciones en un Sistema de PCR de Tiempo Real Rápido ABI 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA); 30 minutos a 48 °C, 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Los resultados se analizaron usando el software SDS2.3 (Applied Biosystems). Se obtuvieron todos los conjuntos de

cebadores y sondas de Applied Biosystems (Foster City, CA). Se normalizó el nivel de expresión de genes objetivo al nivel de expresión del gen Gus B de mantenimiento casero y se expresó como cantidad relativa. El tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 redujo la expresión de HES1 e incrementó la expresión de ATOH-1 en comparación a tumores tratados de control (Figura 7A).

5 En algunas formas de realización, se establecieron colonias de células tumorales OMP-C11 agotadas del linaje de ratón usando condiciones de cultivo conocidas para mantener células tumorigénicas *in vitro*. Estas colonias de células tumorales se colocaron con células 3T3 sin (3T3) incluyendo DLL4 humano (DLL4) sobreexpresado en la superficie celular en la presencia o ausencia de 10 µg/ml de 21M18 murino o inhibidor de gamma-secretasa 5 µM (GSI, es decir DBZ). También se incluyó un control sin cubierta). En tanto que las células 3T3-DLL4 indujeron la expresión del gen HES1 y suprimieron la expresión del gen ATOH1 (mostrado como relación de HES1:ATOH1), ya sea 21M18 o GSI solo se inhibieron cambios de gen objetivo de Notch inducidos por DLL4.

Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento

15 En ciertas formas de realización, se usan líneas de células de cáncer que expresan DLL4 o células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente hecha pasar como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (como se describe en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediada por un anticuerpo contra DLL4. Se suspendieron células en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con antibióticos y 5 % de FBS a 10⁶ células/ml. Entonces se mezclaron las células suspendidas con 200 µl de suero o suero inactivado con calor con anticuerpos contra DLL4 o anticuerpos de control en triplicado. Las mezclas de células se incubaron durante 1 a 4 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Entonces se recolectaron en células tratadas, se re-suspendieron en 100 µl de anexina V marcada con FITC diluida en medio de cultivo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se adicionan cien microlitros de una solución de yoduro de propidio (25 µg/ml) diluida en HBSS y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se recolectan, se re-suspenden en medio de cultivo y se analizan por citometría de flujo. La citometría de flujo de geles teñidos con FITC proporciona cuentas celulares totales, y captación de yoduro de propidio por células muertas como un porcentaje del número total de células, se usa para medir la muerte celular en la presencia de suero y anticuerpos contra DLL4 en comparación a suero inactivado con calor y anticuerpos de control. De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para mediar la citotoxicidad dependiente de complemento.

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

35 En ciertas formas de realización, se usan líneas de células de cáncer que expresan DLL4 o células madre de cáncer aisladas de una muestra de paciente hecha pasar como un xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (como se describe en detalle más adelante) para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) mediada por un anticuerpo contra DLL4. Se suspenden células en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640 libre de rojo de fenol complementado con antibióticos y 5 % de FBS a 10⁶ células/ml. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica tratada con heparina por centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque para el uso como células efectoras. Entonces se mezclan las células objetivo (T) con células efectoras (E) PBMC a relaciones de E/T de 25:1, 10:1 y 5:1 en placas de 96 pocillos en la presencia de al menos un anticuerpo de DLL4 o un anticuerpo de control. Los controles incluyen incubación de células objetivo solas y células efectoras solas en la presencia de anticuerpo. Se incuban mezclas de células durante 1 a 6 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Entonces se mide lactato-deshidrogenasa liberada (LDH), una enzima citosólica estable liberada en la lisis celular, por un ensayo colorimétrico (Ensayo de Citotoxicidad no Reactiva CytoTox96; Promega, Madison, WI). Se recolectan los datos de absorbancia a 490 nm con un lector de placa normal de 96 pocillos y se corrige el fondo. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula de acuerdo a la fórmula: % de citotoxicidad = 100 x ((liberación experimental de LDH – liberación espontánea efectora de LDH - liberación espontánea objetivo de LDH)/(liberación máxima objetivo de LDH – liberación espontánea objetivo de LDH). De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos contra DLL4 para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Ejemplo 3: Prevención *in vivo* del crecimiento tumoral usando anticuerpos anti-DLL4

55 Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-DLL4 para prevenir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto. En ciertas formas de realización, se preparan células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido o efusión pleural) que se ha hecho pasar como un xenoinjerto en ratones para el re-paso en animales experimentales. Se remueve el tejido tumoral bajo condiciones estériles, se cortan piezas pequeñas, se pica completamente usando cuchillas estériles, y las suspensiones celulares individuales se obtienen por digestión enzimática y rompimiento mecánico. De manera específica, se mezclan células de fusión pleural o las piezas de tumor resultante con colagenasa III ultrapura en medio de cultivo (200-250 unidades de colagenasa por mL) y se incuban a 37 °C durante 1-4 horas con pipeteado hacia arriba y hacia abajo a través de una pipeta de 10 mL cada 15-20 minutos. Las células digeridas se filtran a través de una malla de nylon de 40 µM, se lavan con solución salina amortiguada de Hank (HBSS) que contiene 2 % de suero de becerro inactivado con calor (HICS) y HEPES 25mM (pH 7.4). Entonces, las células tumorales disociadas se inyectan subcutáneamente en las almohadillas grasas mamarias de ratones NOD/SCID para producir crecimiento tumoral.

En ciertas formas de realización, primero se clasifican las células tumorales disociadas en células tumorigénicas y no tumorigénicas basándose en los marcadores de superficie celular antes de la inyección en animales experimentales. De manera específica, las células tumorales disociadas como se describe anteriormente se lavan dos veces con solución salina amortiguada con Hepes (HBSS) que contiene 2 % de suero de becerro inactivado con calor (HICS) y se re-suspenden a 10^6 células por 100 μ l. se adicionan anticuerpos y las células se incuban durante 20 minutos en hielo seguido por dos lavados con HBSS/2 % de HICS. Los anticuerpos incluyen anti-ESA (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), anti-CD44, anti-CD24, y marcadores de Linaje anti-CD2, -CD3, -CD10, CD16, -CD18, -CD31, -CD64, y -CD140b (referidos colectivamente como Lin; BD Biosciences, San Jose, CA). Se conjugan directamente los anticuerpos a fluorocromos para seleccionar de manera positiva o negativa células que expresan estos marcadores. Se eliminan células de ratón al seleccionar contra células H2Kd+ y CD45+ murinas, y se eliminan las células muertas al usar el tinte de viabilidad DAPI. Se realiza la citometría de flujo en un FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA). Se usan los perfiles de dispersión lateral y dispersión delantera para eliminar las masas celulares. Entonces se inyectan subcutáneamente células tumorigénicas ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin, aisladas en ratones NOD/SCID para producir crecimiento tumoral.

En ciertas formas de realización, se analizaron anticuerpos anti-DLL4 para su capacidad para reducir el crecimiento de células de tumor de colon UM-C4. Subcutáneamente se inyectaron células UM-C4 disociadas (10.000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones MOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de células tumorales, los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 (n=5) o PBS (n=10) dos veces por semana durante la duración del experimento. Se monitorizó el crecimiento de tumor semanalmente hasta que se detectó crecimiento, punto después del cual se midió el crecimiento del tumor dos veces por semana durante un total de 8 semanas. El tratamiento con anticuerpo 21M18 redujo el crecimiento de tumor por 54 % en comparación a controles inyectados con PBS (Figura 8).

Entonces se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-DLL4 para afectar la proliferación *in vivo*. Se aislaron tumores de colon C8 de animales tratados con anticuerpos 21M18 murinos o anticuerpos de control y se determinó la expresión de Ki67, un marcador de la proliferación celular, por inmunocitoquímica. De manera específica, se cortaron tumores incrustados en parafina, fijados con formalina en secciones de 4 μ m de grueso. Se desparafinaron las secciones en xileno y se re-hidrataron en agua destilada. Se realizó la inmunohistoquímica de acuerdo a métodos normales. De forma breve, se sumergieron secciones en amortiguador de citrato (pH 6) en un baño de agua durante 20 minutos en la cámara Decoking para recuperar los antígenos. Los cortes se enfriaron durante aproximadamente 45 minutos y se enjuagaron en PBS. Se incubaron secciones con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente para remover peroxidasa endógena antes de la adición de anticuerpo primario. El Ki67 anti-humano de conejo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) a dilución 1:50 en amortiguador de dilución de caballo (1 % NHS, 1 % BSA, 0,1 % Tx-100, 0.05 % NaN3 en PBS) se adicionó a cada sección y se incubó durante 1 hora o durante la noche a 4 °C. Los cortes se incubaron tres veces en amortiguador de lavado (Gelatina 10 %, Tx-100 10 %, en PBS) durante 5 minutos cada uno. El anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con solución de HRP (Immpress anti-Rabbit pre-diluted, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) se adicionó a los cortes y se incubó durante 30 minutos. Después del lavado extensivo con amortiguador de lavado, se adicionó Rojo Vector Nova (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Los cortes se enjuagaron con agua, se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con medio de montaje permanente (Vectamount, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). El tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 redujo el número de células que expresan Ki67 en comparación a tumores tratados de control (Figura 9).

Ejemplo 4: Prevención y tratamiento *in vivo* del crecimiento tumoral usando anticuerpos anti-DLL4 en terapia de combinación

Anticuerpos frente a DLL4 en combinación con fluorouracilo

En ciertas formas de realización, se analizaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con quimioterapia para la capacidad para reducir el crecimiento de células de tumor de colon UM-C4 *in vivo*. Se inyectaron subcutáneamente células UM-C4 disociadas (10.000 por animal) en la región del flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 o PBS dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin tratamiento concurrente con el agente de quimioterapia anti-metabolito, fluorouracilo (5-FU), administrado una vez por semana. Se monitorizó el crecimiento tumoral semanalmente hasta que se detectó el crecimiento, punto después del cual se midió el crecimiento del tumor dos veces por semana durante un total de 8 semanas. El tratamiento con anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 en combinación con 5-FU redujo el crecimiento tumoral a un mayor grado que cualquiera de los tratamientos de forma individual (Figuras 10).

Anticuerpos frente a DLL-4 en combinación con anticuerpos frente a EGFR o VEGF

En ciertas formas de realización, se probaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con anticuerpos anti-receptor de EGF (EGFR) para la capacidad para afectar la frecuencia de captación de tumor *in vivo*. Se inyectaron subcutáneamente células UM-C4 disociadas (10.000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones

- NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, los animales (n=10) se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4, anticuerpos anti-EGFR, una combinación de anticuerpos anti-DLL4 y anti-EGFR, o PBS. Se detectaron tumores en todos los animales tratados con anticuerpos anti-DLL4 o anti-EGFR y 9 de 10 animales de control. En contraste, solo 2 de 10 animales tratados con una combinación de anticuerpos anti-DLL4 y anti-EGFR tuvieron tumores detectables varias semanas después del tratamiento (Figura 11). Adicionalmente, el tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 en combinación con anticuerpos anti-EGFR redujo la frecuencia de tumorigénesis versus ya sea tratamiento solo (Figura 11).
- En ciertas formas de realización, se aprobaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con anticuerpos anti-receptor de EGF (EGFR) para la capacidad para afectar la frecuencia de captación de tumor *in vivo*. Se implantaron células de tumor C17 en ratones (n=10 por grupo) y se inició el tratamiento dos días después con ya sea anticuerpo de control, 21M18 murino, anticuerpos anti-VEGF, o la combinación de ambos anticuerpos. Cada anticuerpo se dosificó a 10 mg/kg, dado dos veces por semana. Tanto 21M18 como anti-VEGF redujeron el crecimiento tumoral, y la combinación fue más efectiva que cualquier anticuerpo solo (Figura 18).

Anticuerpos frente a DLL-4 en combinación con irinotecán

- En ciertas formas de realización, se probaron anticuerpos anti-DLL4 en combinación con el quimioterapéutico irinotecán. En algunas formas de realización, se inyectaron células disociadas de tumor OMP-C8 (10.000 por animal) subcutáneamente en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, se inyectaron animales intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 o anticuerpo de control dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin tratamiento concurrente con el agente quimioterapéutico irinotecán administrado una vez por semana a una dosis de 7.5 mg/kg. Se monitorizó semanalmente el crecimiento de tumor hasta que se detectó el crecimiento, punto después del cual se midió dos veces por semana el crecimiento del tumor. El tratamiento con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 en combinación con irinotecán redujo el crecimiento tumoral a un mayor grado que cualquier tratamiento solo (Figura 12A). Y, en tanto que el crecimiento del tumor continuó o se aceleró en la mayoría de los animales después del cese del tratamiento semanal con 7.5 mg/kg de irinotecán solo, la combinación de 10 mg/kg, dos veces por semana, de 21M18 anti-DLL4 y 7.5 mg/kg dos veces por semana de irinotecán previno adicionalmente el crecimiento del tumor de colon después del cese del tratamiento en el día 56 durante más de cinco semanas (Figura 13).
- En ciertas formas de realización, se probaron anticuerpos H7L2 21M18 humanizados anti-DLL4 en combinación con irinotecán. En algunas formas de realización, se inyectaron subcutáneamente células de tumor C8 disociadas (10.000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. El día después de la inyección de las células tumorales, se inyectaron animales intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 humanizados anti-DLL4, anticuerpos 21M18 murinos, o anticuerpos de control dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin el tratamiento concurrente con el agente de quimioterapia, irinotecán, administrado una vez por semana a una dosis de 7.5 mg/kg. Se monitorizó semanalmente el crecimiento del tumor hasta que se detectó el crecimiento, punto después del cual se midió dos veces por semana el crecimiento del tumor. El tratamiento con anticuerpos 21M18 anti-DLL4 humanizados en combinación con irinotecán mostró eficiencia similar contra crecimiento de tumor como 21M18 murino (Figura 12B).
- En algunas formas de realización, se usó el tratamiento de combinación con 21M18 murino anti-DLL4 e Irinotecán para tratar tumores de colon establecidos. Se inyectaron subcutáneamente células C8 disociadas (10.000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Cuando las células inyectadas produjeron tumores de aproximadamente 60 mm³, se comenzó el tratamiento. Los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.), con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4, o un control dos veces por semana durante la duración del experimento con o sin el tratamiento concurrente con el agente de quimioterapia, irinotecán, administrado una vez por semana a una dosis de 7.5 mg/kg. El tratamiento con los anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4 en combinación con irinotecán redujo el crecimiento de tumores establecidos de colon a un mayor grado que cualquier tratamiento solo (Figura 14).
- En algunas formas de realización, la terapia de combinación seguida por tratamiento con anticuerpo retrasó la reincidencia del tumor. Se inyectaron subcutáneamente células C8 disociadas (10.000 por animal) en la región de flanco derecho de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Cuando las células inyectadas produjeron tumores de aproximadamente 150 mm³, se comenzó el tratamiento. Se administraron intraperitonealmente (i.p.), animales con 10 mg/kg de anticuerpos 21M18 murinos anti-DLL4, o de control dos veces por semana en combinación con irinotecán a 7.5 mg/kg una vez por semana durante un total de 32 días. Entonces se descontinuó el tratamiento de combinación y se trataron los anticuerpos con anticuerpos 21M18 de DLL4 o de control para el resto del experimento. El tratamiento con los anticuerpos 21M18 anti-DLL4 después de la terapia de combinación retrasó significativamente la reincidencia del crecimiento tumoral en comparación a los animales tratados con control (Figura 16). También se muestra el volumen inicial de tumor a los 47 días después de la terminación del tratamiento con irinotecán (Figura 17).

La reducción con anticuerpos frente a DLL4 de la frecuencia de células madre de cáncer se mejora mediante irinotecán

En ciertas formas de realización, usando un análisis de dilución limitante se determinó la capacidad de los anticuerpos 21M18 anti-DLL4 solos o en combinación con irinotecán para reducir la frecuencia de células madre de cáncer. Después de 38 días de tratamiento, se aislaron tumores de colon C8 de ratones tratados con ya sea anticuerpos de control o 21M18 murinos de DLL4, irinotecán, o anticuerpos 21M18 murinos de DLL4 en combinación con irinotecán como se describe anteriormente. Como se describe más adelante se procesaron los tumores aislados (n=3 por grupo experimental). Los tumores se removieron, y se picaron con una cuchilla estéril. Para obtener suspensiones celulares individuales, se mezcló una solución de digestión que contiene Colagenasa/Hialuronidasa:Dispasa (1:1:8 de 10X) en el medio MEBM (Cambrex, East Rutherford, NJ) con una dilución 1:100 de DNAsal (Worthington, Lakewood, NJ) con la suspensión de tumores se incubó a 1 hora a 37 °C. Las células se centrifugaron y se re-suspendieron en 1 ml de medio ACK (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10 mm, Na₂EDTA 0,1 mM en agua destilada) en hielo durante 2 minutos para remover células sanguíneas rojas. Las células se centrifugaron y se re-suspendieron a una concentración de 1 x 10⁷ células/ml en amortiguador FACS y luego se incubaron con anticuerpos de ratón biotinilados (dilución 1:200 de α CD45 de ratón-biotina y dilución 1:100 de α-H2Kd de ratón-biotina de rata, BioLegend, San Diego, CA) en hielo durante 30 minutos seguido por la adición de cuentas magnéticas de estreptavidina (Invitrogen, Carlsbad, CA) para remover células de ratón. Las células humanas restantes en la suspensión se recolectaron, se contaron y diluyeron al la concentración deseada para uso adicional. Entonces se re-inyectaron diluciones en serie de células humanas en ratones inmunocomprometidos. De manera específica, se inyectaron ratones con 900, 300, 100 o 50 células tumorales humanas aisladas en la región del flanco derecho (n=10 por grupo). Se valoró dos veces por semana el volumen del tumor.

Al término del estudio en el día 81, se disminuyó el porcentaje de ratones con tumores detectables en todos los grupos inyectados con el anticuerpo 21M18 de DLL4 tratados con células de tumor y aún disminuyó adicionalmente en células tumorales tratadas con 21M18 de DLL4-irinotecán en comparación a aquellas tratadas con ya sea control o irinotecán solo (Figura 15A). Usando estas frecuencias de generación de tumor, se calculó la frecuencia de células madre usando estadísticas Poisson proporcionado por el software L-Calculator™ (descargable de <http://www.stemcell.com/search/default.asp>). De forma concisa, basándose en las estadísticas de distribución de Poisson, exactamente una célula madre existe entre el número conocido de células inyectadas si 37 % de los animales fallan en desarrollar tumores. El tratamiento de tumores con irinotecán solo incrementó el número de células madre de cáncer de 1:93 en tumores tratados con control a 1:82. En contraste, los anticuerpos anti-DLL4 redujeron la frecuencia de células madre de cáncer desde 1:93 en tumores tratados con control a 1:238 en tumores tratados con anticuerpo de DLL4 y a 1:573 en las células de tumor tratadas con la combinación de 21M18 de DLL4-Irinotecán (Figura 15B).

Ejemplo 5: Tratamiento *in vivo* de tumores usando anticuerpos anti-DLL4

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos 21M18 humanizados anti-DLL4 para tratar cáncer en un modelo de xenoinjerto. En ciertas formas de realización, para el re-paso en animales experimentales se preparan células tumorales de una muestra de paciente (biopsia de tumor sólido o efusión pleural) que se ha hecho pasar como un xenoinjerto en ratones. Se remueve el tejido tumoral, se corta en piezas pequeñas, se pica completamente usando cuchillas estériles, y las suspensiones celulares individuales se obtiene por digestión enzimática y rompimiento mecánico. Entonces se inyectan subcutáneamente células tumorales disociadas ya sea en las almohadillas grasas mamarias, para tumores de mama, o en el flanco, para tumores no de mama, de ratones NOD/SCID para producir crecimiento de tumor. De manera alternativa, se aíslan células tumorigénicas de tumor ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin como se describe en detalle anteriormente y se inyectan.

Después de la inyección de células de tumor, los animales se monitorizan para el crecimiento de tumor. Una vez que los tumores alcanzan un tamaño promedio de aproximadamente 100 mm³, empieza el tratamiento con anticuerpo. Cada animal recibe 100 µg de anticuerpos humanizados 21M18 de DLL4 o anticuerpos de control i.p., dos a cinco veces por semana durante un total de 6 semanas. Se valora dos veces por semana el tamaño del tumor durante estas 6 semanas. De esta manera se determina la capacidad de los anticuerpos humanizados de DLL4 para prevenir el crecimiento tumoral adicional o para reducir el tamaño de tumor en comparación a anticuerpos de control.

En el punto final del tratamiento con anticuerpo, se recolectan los tumores para análisis adicional. En algunas formas de realización, se analiza una porción del tumor por inmunofluorescencia para valorar la penetración del anticuerpo en el tumor y la respuesta de tumor. Una porción de cada tumor recolectado de ratones tratados con anticuerpo de control o tratados con anti-DLL4 se congela frescos en nitrógeno líquido, se incrustan en O.C.T., y se corta en un criostato como secciones de 10 µm en portaobjetos de vidrio. En algunas formas de realización, una porción de cada tumor se fija en formalina, se incrusta en parafina y se corta en un micrótopo como sección de 10 µm en portaobjetos de vidrio. Las secciones de pos-fijan e incuban con anticuerpos marcados con cromóforo que reconocen específicamente anticuerpos inyectados para detectar anticuerpos de control o anti-receptor de DLL4 presentes en la biopsia de tumor. Adicionalmente, los anticuerpos que detectan diferentes tipos de células tumorales y reportadas por tumor tal como por ejemplo, anti-cadherina VE (CD144) o anticuerpos anti-PECAM-1 (CD31) para detectar células endoteliales vasculares, anticuerpos anti-alfa-actina de músculo liso para detectar células de

músculo liso vascular, anticuerpos anti-Ki67 para detectar células proliferantes, ensayos de TUNEL para detectar células muriendo, anticuerpos de fragmento Notch anti-dominio intracelular (DIC) para detectar señalización de Notch, se pueden usar para valorar los efectos del tratamiento con anticuerpo, por ejemplo, en la angiogénesis, crecimiento de tumor y morfología de tumor.

5 En ciertas formas de realización, también se valora el efecto del tratamiento con anticuerpos humanizados anti-DLL4 en la expresión génica de células de tumor. Se extrae el ARN total de una porción de cada tumor recolectado de ratones tratados con anticuerpo de DLL4 y tratados con anticuerpo de control y se usan para RT-PCR cuantitativa. Se analizan los niveles de expresión de DLL4, receptores de Notch, componentes de la ruta de señalización de Notch, así como marcadores de células madre de cáncer anteriormente identificados (por ejemplo, CD44) con relación al gen de mantenimiento doméstico GAPDH con un control interno. De esta manera se determinan los cambios en la expresión génica de células tumorales en el tratamiento con anticuerpos de DLL4.

15 Además, se valor el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 en la presencia de células madre de cáncer en un tumor. Las muestras de tumor de ratones tratados con anticuerpo de DLL4 versus anticuerpo de control se cortan en pequeñas piezas, se pican completamente usando cuchillas estériles, y las suspensiones celulares estériles se obtienen por digestión esquemática y rompimiento mecánico. Entonces se analizan las células tumorales disociadas por análisis de FACS para la presencia de células madre de cáncer, tumorigénicas basándose en la expresión del marcador de superficie celular ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin como se describe en detalle anteriormente.

20 La tumorigenicidad de células aisladas basadas en la expresión de ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin después del tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 entonces se valora. En las almohadillas grasas mamarias de ratones NOD/SCID se re-inyectan subcutáneamente células madre de cáncer ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin aisladas de ratones tratados con anticuerpo de DLL4 versus anticuerpo de control. Entonces se determina la tumorigenicidad de células madre de cáncer basándose en el número de células inyectadas requeridas para formación consistente de tumor.

Ejemplo 6: Tratamiento del cáncer humano usando anticuerpos humanizados anti-DLL4

30 Este ejemplo describe métodos para tratar cáncer usando anticuerpos humanizados contra DLL4 a células objetivo que comprenden células madre de cáncer y/o células tumorales en las cuales se ha detectado la expresión del receptor de Notch o el ligando de receptor de Notch. La presencia de la expresión del marcador de células madre de cáncer se puede determinar primero de una biopsia de tumor. Las células tumorales de una biopsia de un paciente diagnosticado con cáncer se remueven bajo condiciones estériles. En algunas formas de realización, la biopsia de tejido se congela fresca en nitrógeno líquido, se incrusta en O.C.T., y se corta en un criostato como secciones de 10 µm en portaobjetos de vidrio. En algunas formas de realización, la biopsia de tejido se fija en formalina, se incrusta en parafina, y se corta en un micrótomos como sección de 10 µm en portaobjetos de vidrio. Se incuban secciones con anticuerpos contra DLL4 para detectar expresión de proteína.

40 También se puede determinar la presencia de células madre de cáncer. Las muestras de biopsia de tejido se cortan en piezas pequeñas, se pican completamente usando cuchillas estériles, y las células se someten a digestión enzimática e interrupción mecánica para obtener una suspensión celular individual. Entonces se incuban células tumorales disociadas con anticuerpos anti-ESA+, CD44+, CD24, Lin, y -DLL4 para detectar células madre de cáncer, y se determina la presencia de células madre de tumor ESA+, CD44+, CD24-/bajo, Lin-, DLL4+ por citometría de flujo como se describe en detalle anteriormente.

50 Con anticuerpos humanizados anti-DLL4 se tratan pacientes con cáncer, cuyos tumores se diagnostican como que expresan un receptor de Notch ligando de receptor de Notch. En ciertas formas de realización, los anticuerpos humanizados anti-DLL4 se generan como se describe anteriormente y se purifican y formulan con un vehículo farmacéutico adecuado para inyección. En algunas formas de realización, los pacientes se tratan con anticuerpos de DLL4 al menos una vez al mes durante al menos 10 semanas. En algunas formas de realización, se tratan pacientes con los anticuerpos de DLL4 al menos una vez por semana durante al menos aproximadamente 14 semanas. Cada administración del anticuerpo debe ser una dosis farmacéuticamente efectiva. En algunas formas de realización, se administra entre aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg/ml de un anticuerpo anti-DLL4. En algunas formas de realización, se administra entre aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml de un anticuerpo anti-DLL4. El anticuerpo se puede administrar antes de, concurrente con, o después de regímenes normales de radioterapia o regímenes normales de quimioterapia usando unió o más agentes quimioterapéuticos, tal como oxaliplatino, fluorouracilo, leucovorina, o estreptozocina. Los pacientes que monitorizan para determinar si este tratamiento ha dado por resultado una respuesta anti-tumor, por ejemplo, basándose en la regresión del tumor, a la reducción en las incidencias de nuevos tumores, a la menor expresión de antígeno de tumor, a los números disminuidos de células madre de cáncer, o a otros medios para evaluar el pronóstico de la enfermedad.

60 Para los expertos en la técnica serán evidentes otras formas de realización de la invención a partir de la consideración de la especificación y de la práctica de la invención divulgada en el presente documento.

65

SEC ID N°: 1 (cadena pesada CDR1)

TAYYIH

SEC ID N°: 2 (cadena pesada CDR2, H2)

YISCYNGATNYNQKFKG

SEC ID N°: 3 (cadena pesada CDR2 H7)

5 YISSYNGATNYNQKFKG

SEC ID N°: 4 (cadena pesada CDR2 H9)

YISVYNGATNYNQKFKG

SEC ID N°: 5 (cadena pesada CDR3)

RDYDYDVGMDY

10 SEC ID N°: 6 (región variable de la cadena pesada, H2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISCYNGATNYNQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N°: 7 (región variable de la cadena pesada, H7)

15 **QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS**

SEC ID N°: 8 (región variable de la cadena pesada, H9)

20 **QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISVYNGATNYNQKFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS**

SEC ID N°: 9 (cadena ligera CDR1)

RASEVDNYGISFMK

SEC ID N°: 10 (cadena ligera CDR2)

25 AASNQGS

SEC ID N°: 11 (cadena ligera CDR3)

QQSKEVPWTFGG

SEC ID N°: 12 (región variable de la cadena ligera)

30 **DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCRASEVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK**

SEC ID N°: 13 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada, H2, región variable)

35 **ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTGTTCCCTGGTGGCTGCTGCTACAGGAGCTCACTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTAGCGGATACTCCTTTACAGCTTACTACATCCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATCGGATATATCAGCTCCTACAACGGA GCTACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCTTACAACAGACACAAGCACAAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGAAGCGACGACACAGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGACTACGACTACGACGTGGGGATG GACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCA**

SEC ID N°: 14 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada, H7, región variable)

40 **ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTGTTCCCTGGTGGCTGCTGCTACAGGAGCTCACTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTAGCGGATACTCCTTTACAGCTTACTACATCCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATCGGATATATCAGCTCCTACAACGGA GCTACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCTTACAACAGACACAAGCACAAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGAAGCGACGACACAGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGACTACGACTACGACGTGGGGATG GACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCA**

SEC ID N°: 15 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada, H9)

45 **ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTGTTCCCTGGTGGCTGCTGCTACAGGAGCTCACTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTAGCGGATACTCCTTTACAGCTTACTACATCCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATCGGATATATCAGCTCCTACAACGGA GCTACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCTTACAACAGACACAAGCACAAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGGAGCCTGAGAAGCGACGACACAGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGACTACGACTACGACGTGGGGATG GACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCA**

SEC ID N°: 16 (secuencia de nucleótidos de la cadena ligera)

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGGGACATCGTGATGACC
 CAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAATCCGTGAT
 AATTATGGCATTTCCTTTATGAAGTGGTTCACAGAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACGCTGCA
 TCCAACCAAGGGTCCGGGGTCCCTGACAGGTCTCCGGCAGCGGGTCCGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTGCAGGTGAAGATGTGGCTGTCTATTACTGTACAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGGACATTCCGAGGAGGG
 ACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCCCTCCGTCTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAA
 AGCGGCACTGCCAGCGTGGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCCGGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGGAT
 AACGCCCTCAAAGCGGCAACTCCCAGGAGAGCGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
 AGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCAGCCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTGA

SEC ID N°: 17 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR1)
 ACAGCTTACTACATCCAC

5 SEC ID N°: 18 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR2, H2)
 ATATCAGCTGTTACAACGGAGCTACAAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC

SEC ID N°: 19 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR2, H7)
 ATATCAGCTCCTACAACGGAGCTACAAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC

10 SEC ID N°: 20 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR2, H9)
 ATATCAGCGTCTACAACGGAGCTACAAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC

SEC ID N°: 21 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR3)
 AGGACTACGACTACGACGTGGGGATGGACTAC

SEC ID N°: 22 (secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR1)
 AGAGCCAGCGAATCCGTCGATAATTATGGCATTTCCTTTATGAAG

15 SEC ID N°: 23 (secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR2)
 GCTGCATCCAACCAAGGGTCC

SEC ID N°: 24 (secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR3)
 CAGCAAAGCAAGGAGGTGCCTTGGACATTGGAGGA

20 SEC ID N°: 25 (antígeno DLL4 humano)

MAAASRSASGWALLLLVALWQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCPEPGCRTFFRVCLKHFQA
 VVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEA WHAPGDDLREALPPD
 ALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQSTLTRLRYSYRVICSDNYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGN
 LSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCTPWQCTCD
 EGWGGFLCDQLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCRPGYTGVDCELELSECDNPNCRNGGSK
 DQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTS
 NPCANGGQCLNRGPPSRMCRCPGFTGTCELVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRC
 EVRTSIDACASSPCFNATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFFPVG

SEC ID N°: 26 (dominio DSL del antígeno DLL4 humano)
 WLLDEQSTLTRLRYSYRVICSDNYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC

25 SEC ID N°: 27 (región N-terminal del DLL4 humano)

MAAASRSASGWALLLLVALWQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCPEPGCRTFFRVCLKHFQA
 VVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEA WHAPGDDLREALPPD
 ALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQSTLTRLRYSYRVICSDNYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGN

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, que es;
- 5 (a) anticuerpo 21 M18 H7L2 codificado por el plásmido depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-8425;
- (b) anticuerpo 21 M18 H9L2 codificado por el plásmido depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-8427; o
- 10 (c) un anticuerpo monoclonal que comprende:
- una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, en la que
- CDR1 es SEC ID N°: 1;
- 15 CDR2 es SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; y
- CDR3 es SEC ID N°: 5; y
- una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, en la que
- CDR1 es SEC ID N°: 9;
- 20 CDR2 es SEC ID N°: 10; y
- CDR3 es SEC ID N°: 11.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1(c), en el que la CDR2 de la cadena pesada es la SEC ID N°: 3.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende:
- 25 (a) una región variable de la cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la SEC ID N°: 7 y
- (b) una región variable de la cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la SEC ID N°: 12.
- 30 4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1(c), en el que la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada son las SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 8 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera es la SEC ID N°: 12.
- 35 5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada SEC ID N°: 7 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera SEC ID N°: 12.
- 40 6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1(c) a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
7. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 8. Un polinucleótido aislado que es el plásmido depositado en la ATCC con número de depósito PTA-8425 o con número de depósito de la ATCC PTA-8427.
9. Un hibridoma que secreta el anticuerpo 21 M18 depositado en la ATCC el 28 de septiembre de 2007 y que tiene el número de depósito en la ATCC PTA-8670.
- 50 10. Una composición farmacéutica que comprende:
- un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
- 55 un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento del cáncer.
12. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el tratamiento del cáncer comprende la administración del anticuerpo y un segundo agente terapéutico.
- 60 13. Uso del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

Figura 1

Unión específica de anticuerpos 21M8 anti-DLL4 frente a la proteína DLL4 de la superficie de células nativas

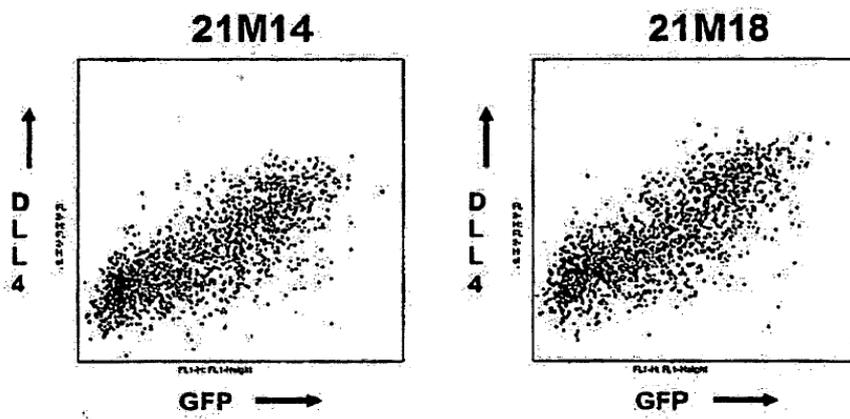
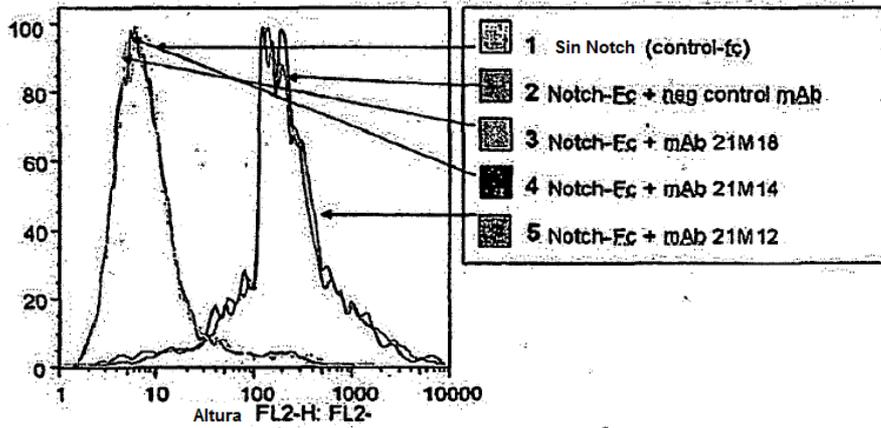


Figura 2

Los anticuerpos frente a DLL4 bloquean la interacción de DLL4 con el receptor Notch humano

A



B

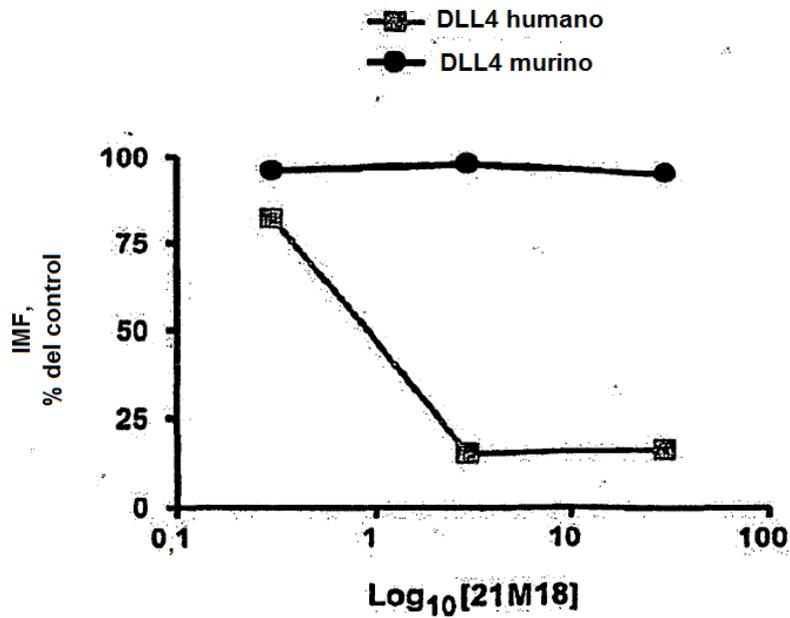


Figura 3

Mapeo del epítipo de los anticuerpos

A

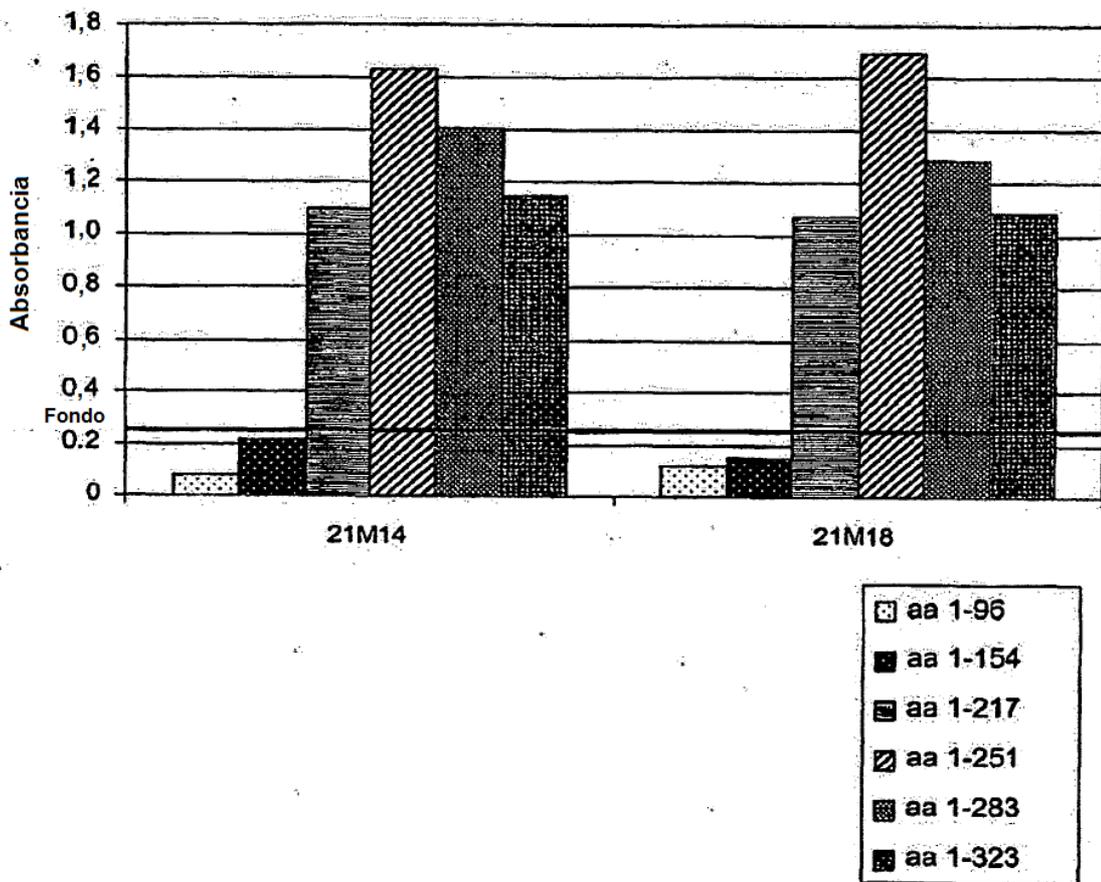


Figura 3B

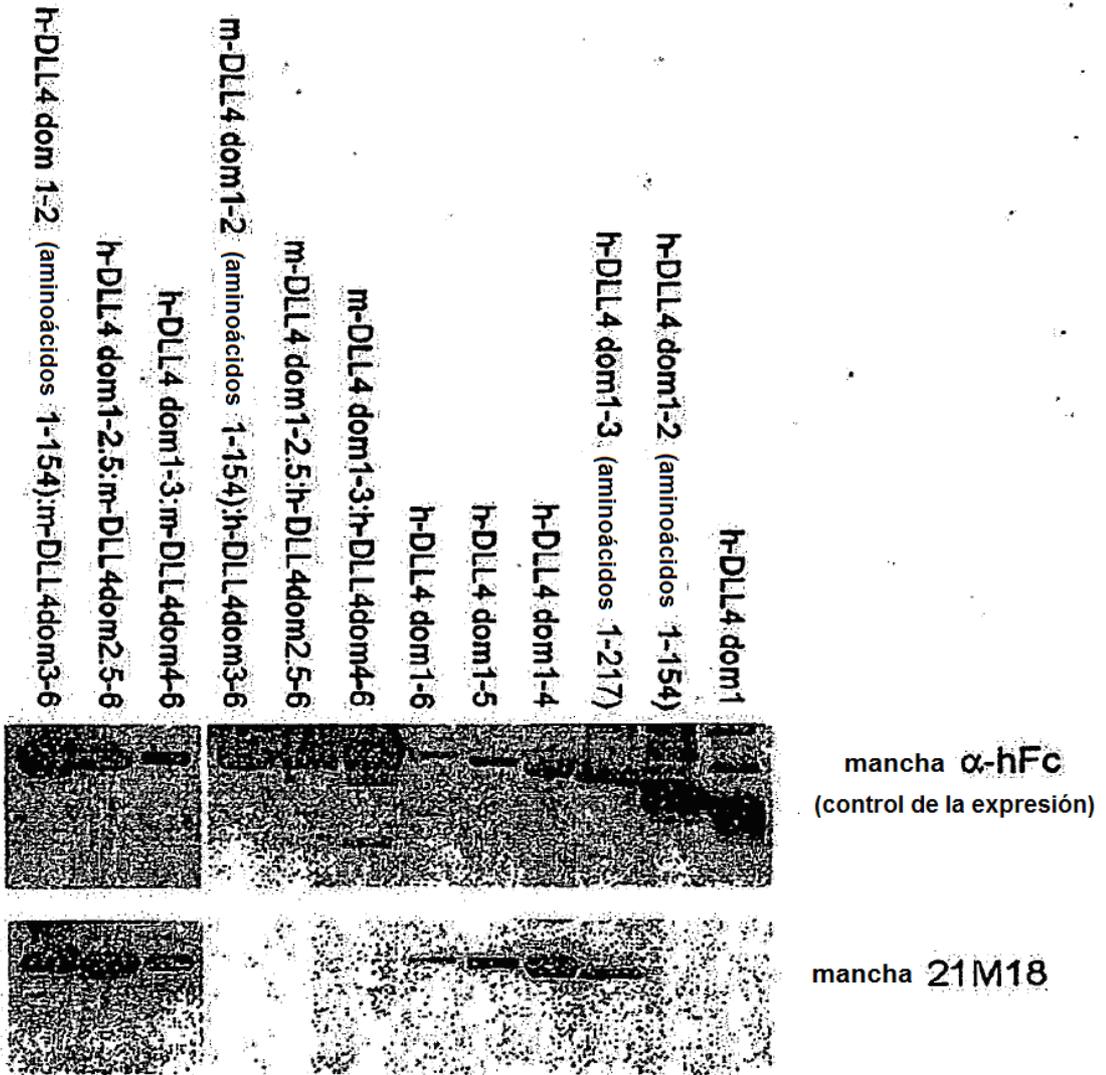


Figura 3C

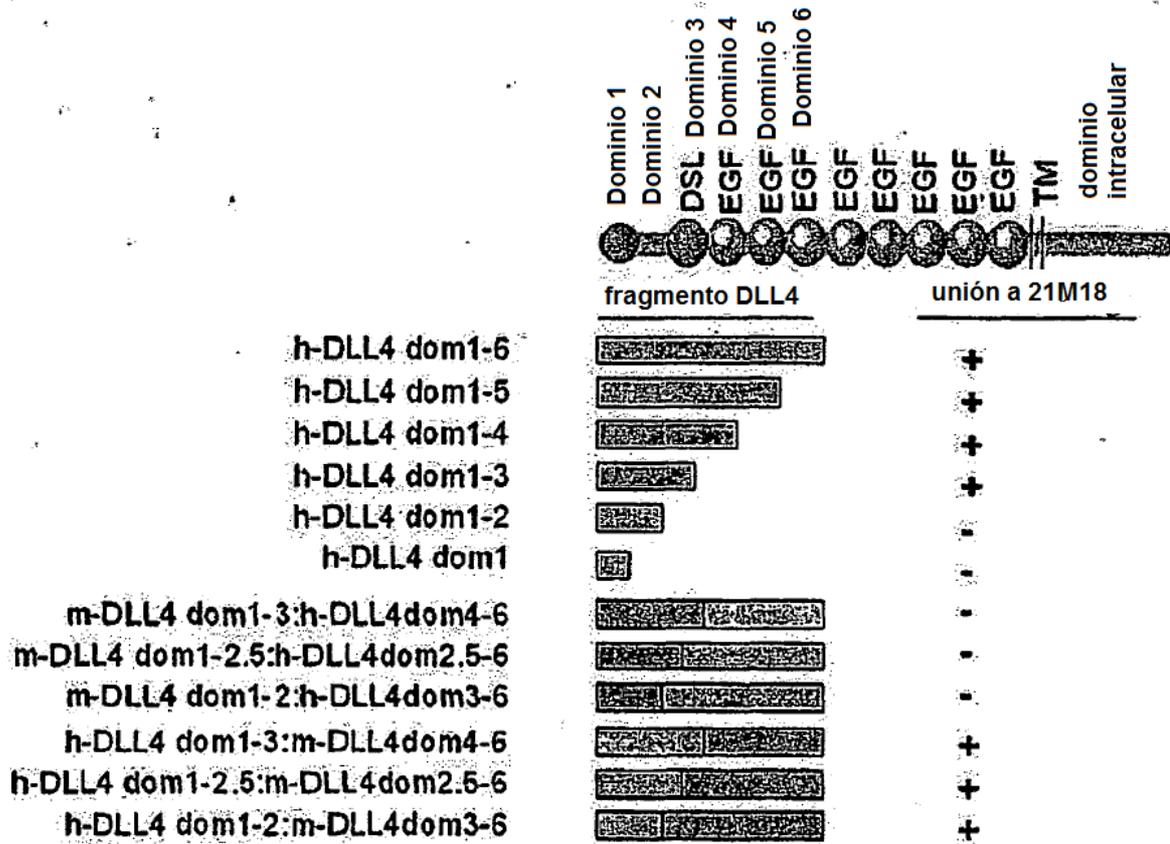


Figura 3D

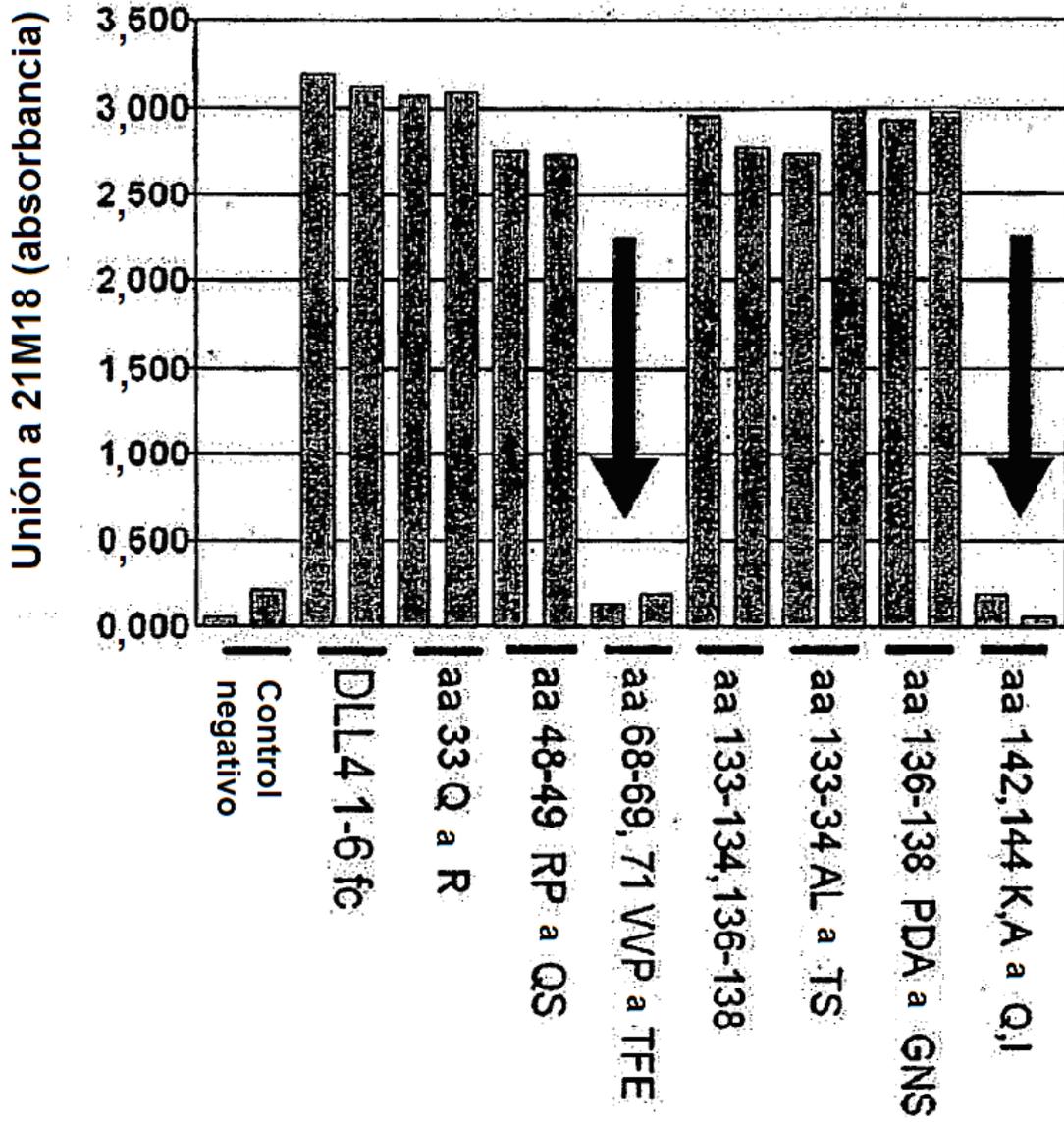


Figura 3E

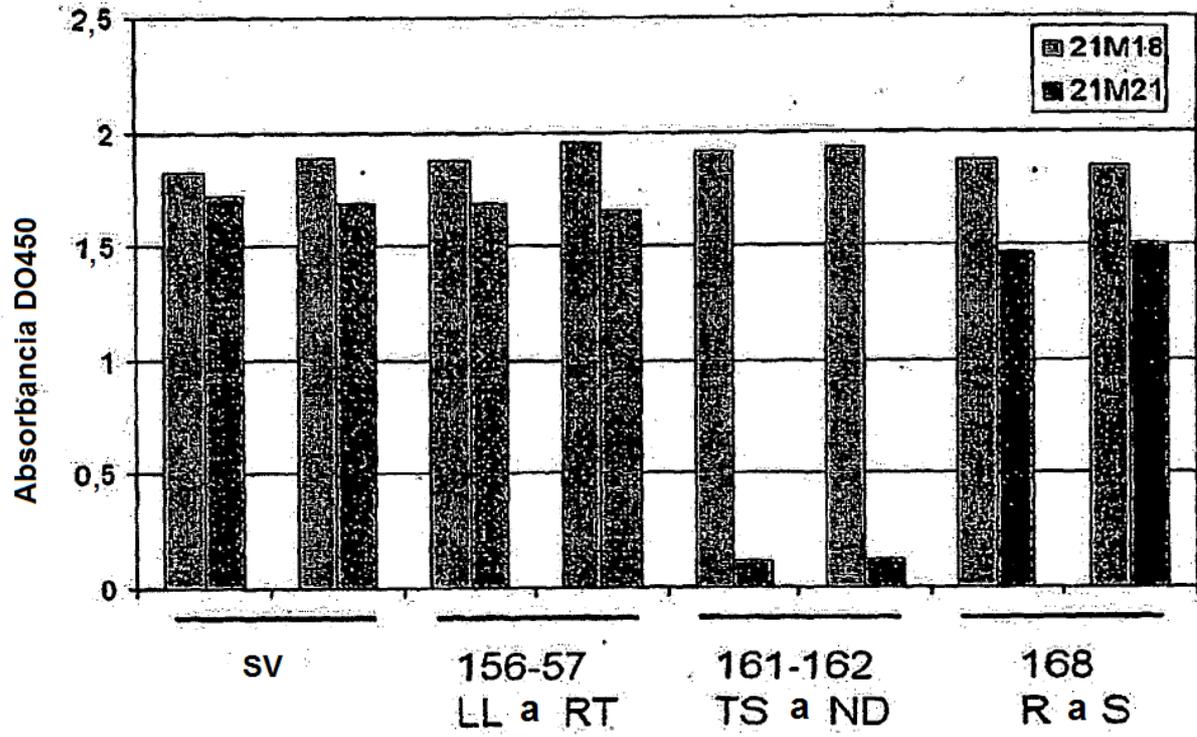


Figura 5

Alineación de la secuencia de la región variable de la cadena ligera

	Secuencia señal	1	CDR-1
m-21M18-Vk	1	MEEEDTLRLWVLLWVDFGSKGDIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDN--YGISFMR	
h- línea germinal-Vk	1	MVLQIQVFISSLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSANNKNDQA	
21M18-L2	1	MVLQIQVFISSLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDN--YGISFMR	
		2	CDR-2
m-21M18-Vk	59	WFQOKPGQPPKLLIYAASNQGSQVDFRFSGSGSCTDFTLTISSLAEDVAVYYCQSQEV	
h- línea germinal-Vk	61	WFQOKPGQPPKLLIYASTRESGVPDRFSGSGSCTDFTLTISSLAEDVAVYYCQSYST	
21M18-L2	59	WFQOKPGQPPKLLIYAASNQGSQVDFRFSGSGSCTDFTLTISSLAEDVAVYYCQSQEV	
		3	CDR-3
m-21M18-Vk	119	E-WTFGGGTRVEIK	
h- línea germinal-Vk	121	E-WTFGGGTRVEIK	
21M18-L2	119	E-WTFGGGTRVEIK	

Figura 6

21M14 y 21M18 bloquean la señalización de Notch mediada por DLL4

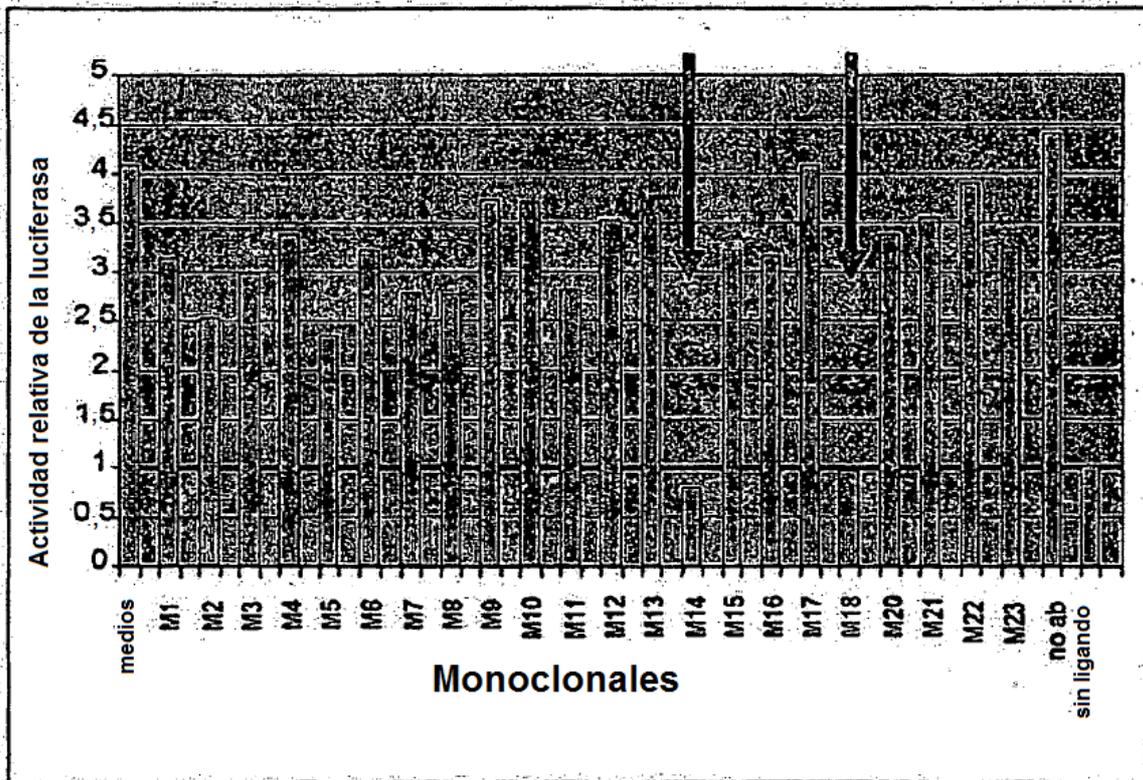
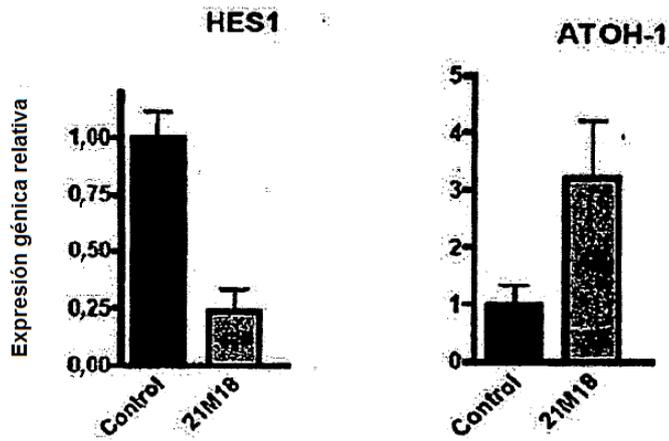


Figura 7

Los anticuerpos frente a DLL4 modulan la expresión de los genes Notch diana en tumores de colon

A



B

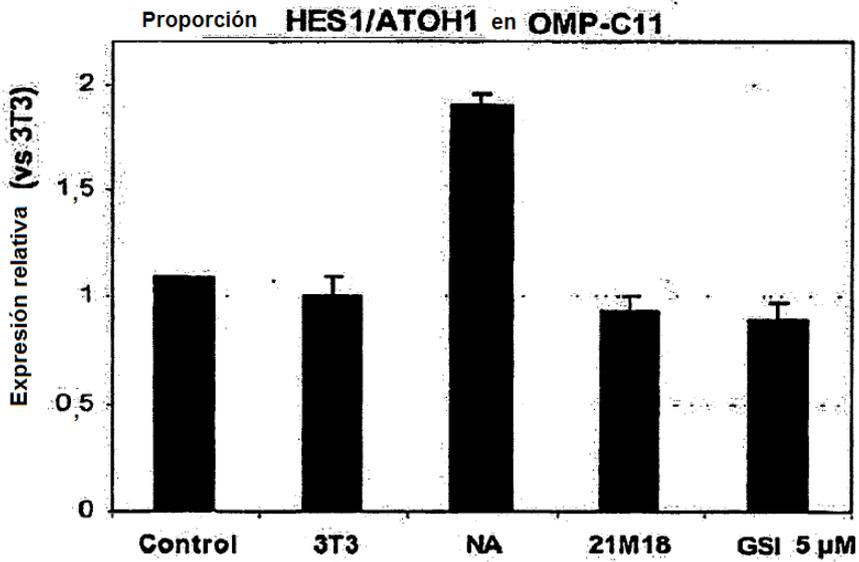
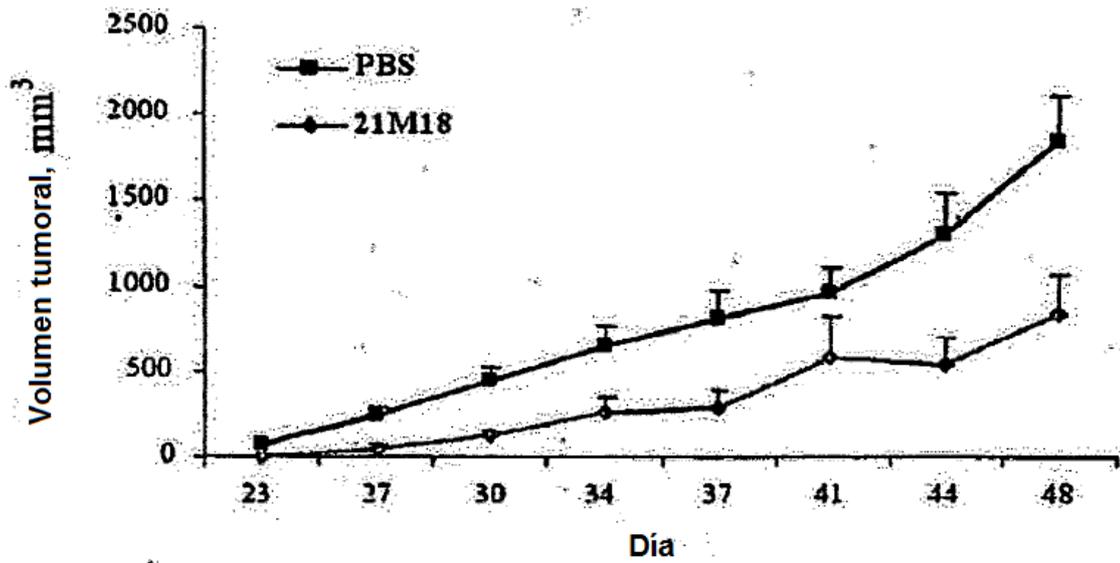


Figura 8

21M18 (anti-DLL4) reduce el crecimiento del tumor de colon UM-C4



Reducción tumoral = 54% p = 0,03

Figura 9

Los anticuerpos anti-DLL4 reducen el número de células tumorales en proliferación in vivo

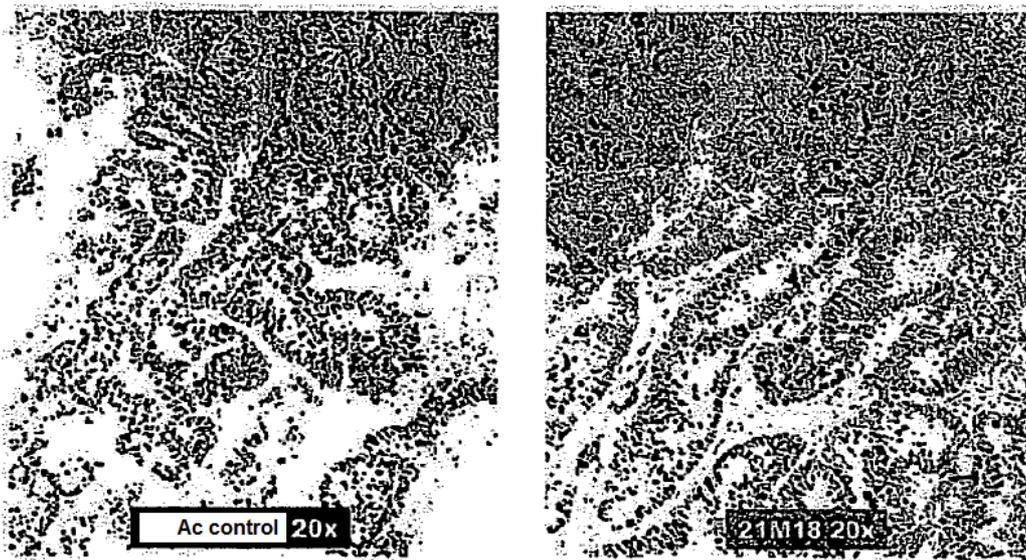
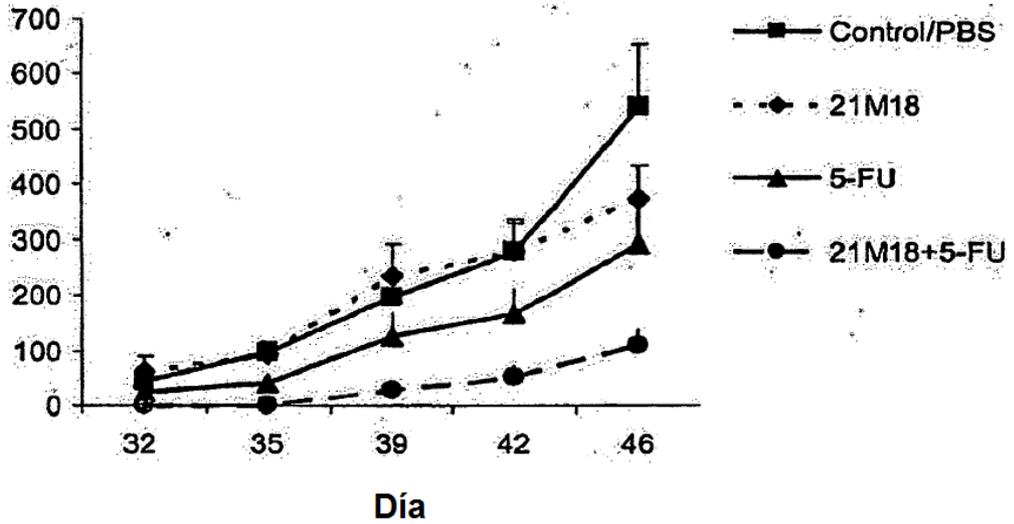


Figura 10

Anti-DLL4 y 5-FU reducen el crecimiento del tumor de colon UM-C4

A



B

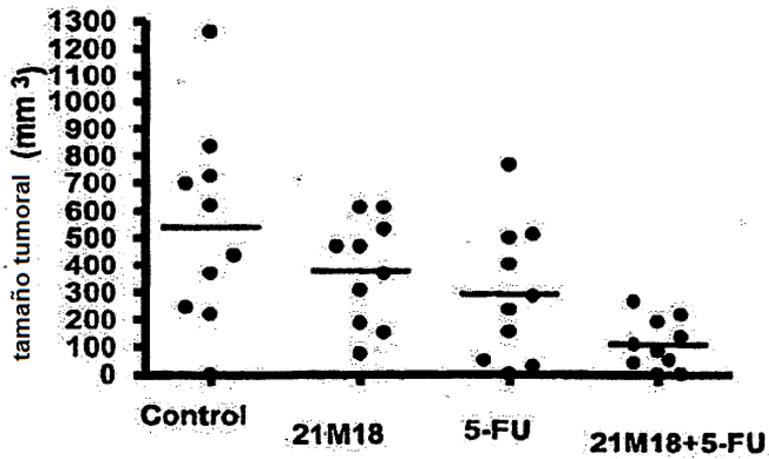


Figura 11

La combinación de anti-DLL4 y anti-EGFR inhibe el crecimiento tumoral de UM-C4

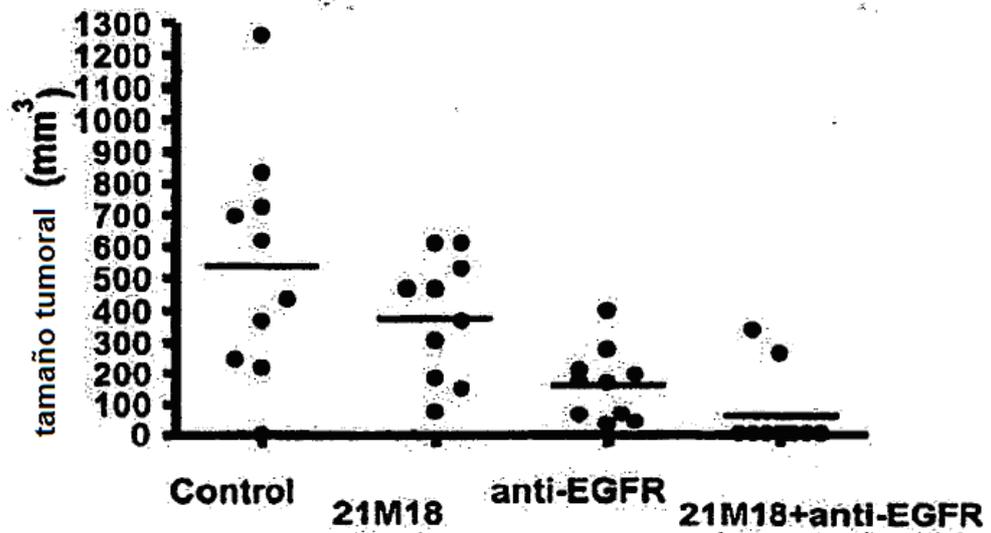


Figura 12

El mAb anti-DLL4 e irinotecán actúan sinérgicamente e inhiben el crecimiento del tumor de colon

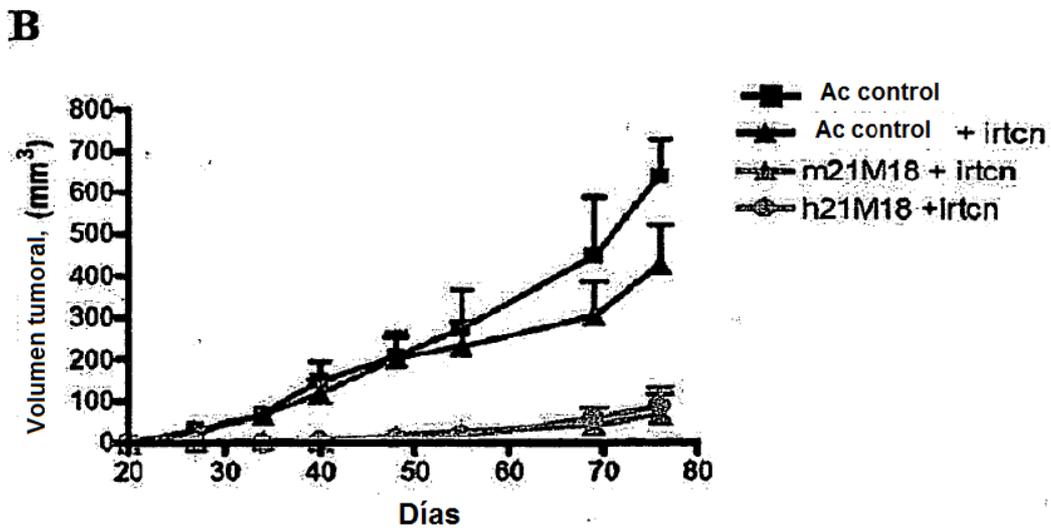
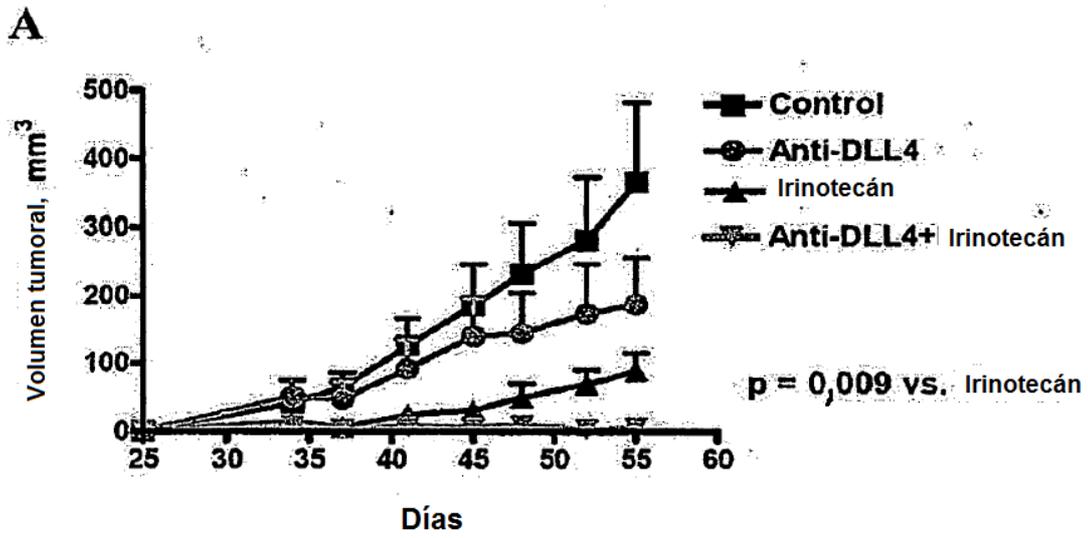
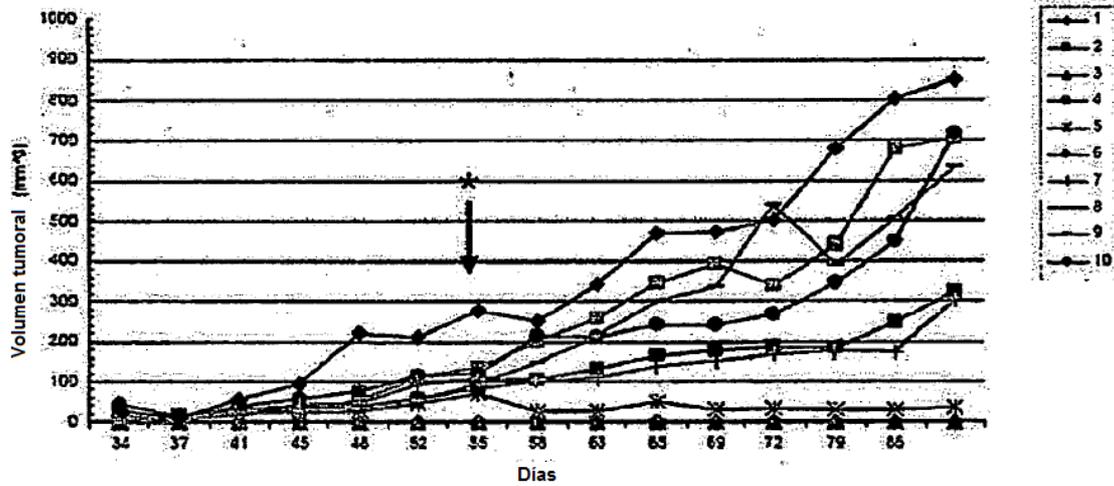


Figura 13

El tratamiento de combinación del mAb anti-DLL4 21M18 e irinotecán previene el recrecimiento del tumor de colon

A

Irinotecán



B

21M18+ Irinotecán

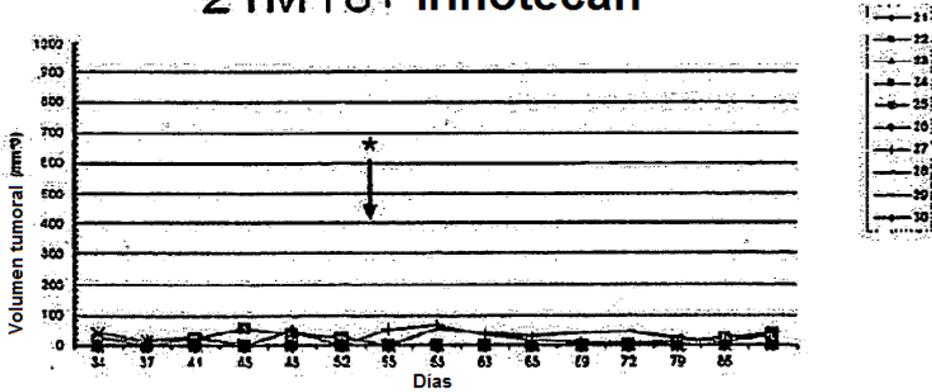


Figura 14

El tratamiento de combinación de antiDLL4 21M18 e irinotecán inhibe el crecimiento de los tumores de colon establecidos con más eficacia que el tratamiento de monoterapia

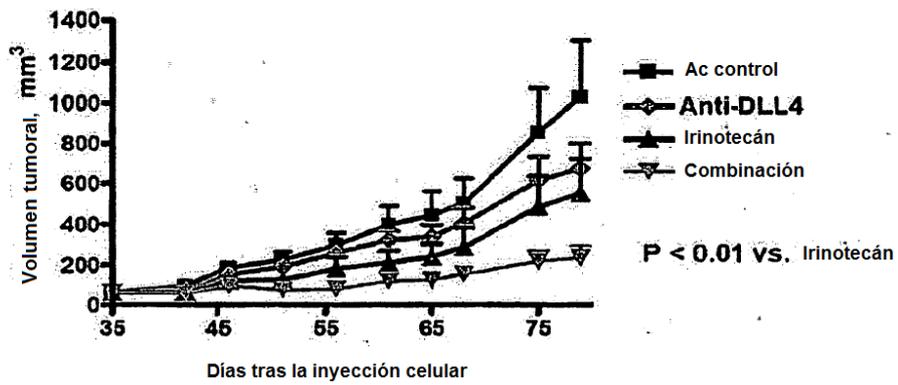


Figura 15A

El tratamiento de combinación con anti-DLL4 21M18 e irinotecán reduce la frecuencia de las células madre

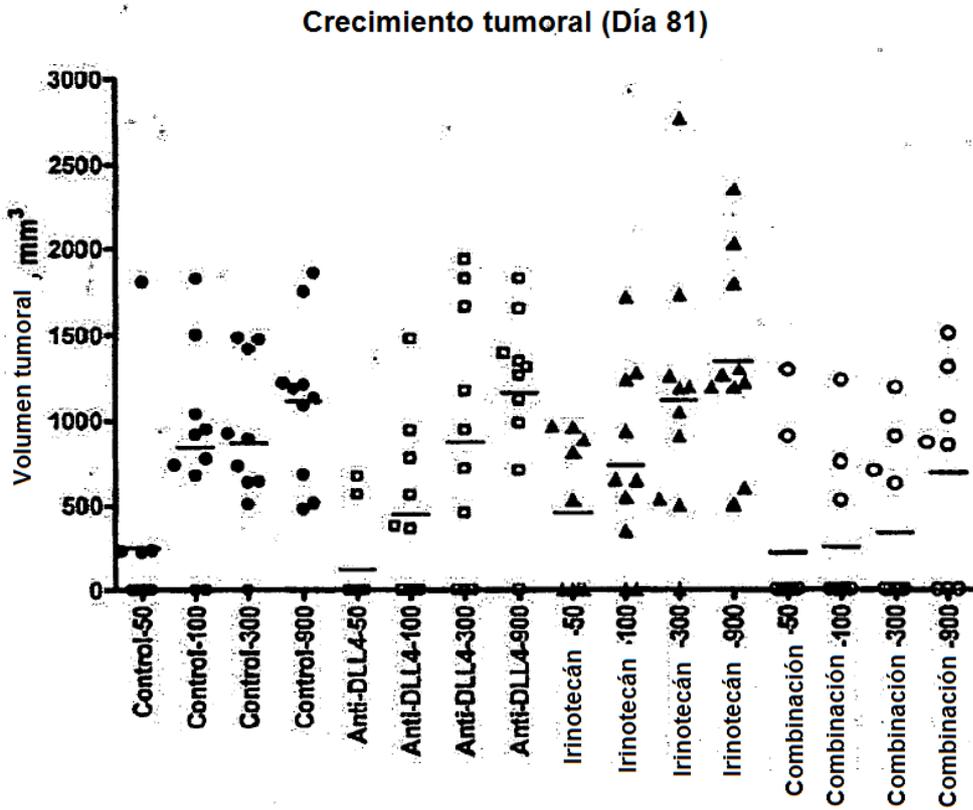


Figura 15B

El tratamiento de combinación de anti-DLL4 21M18 e irinotecán reduce la frecuencia de las células madre cancerosas

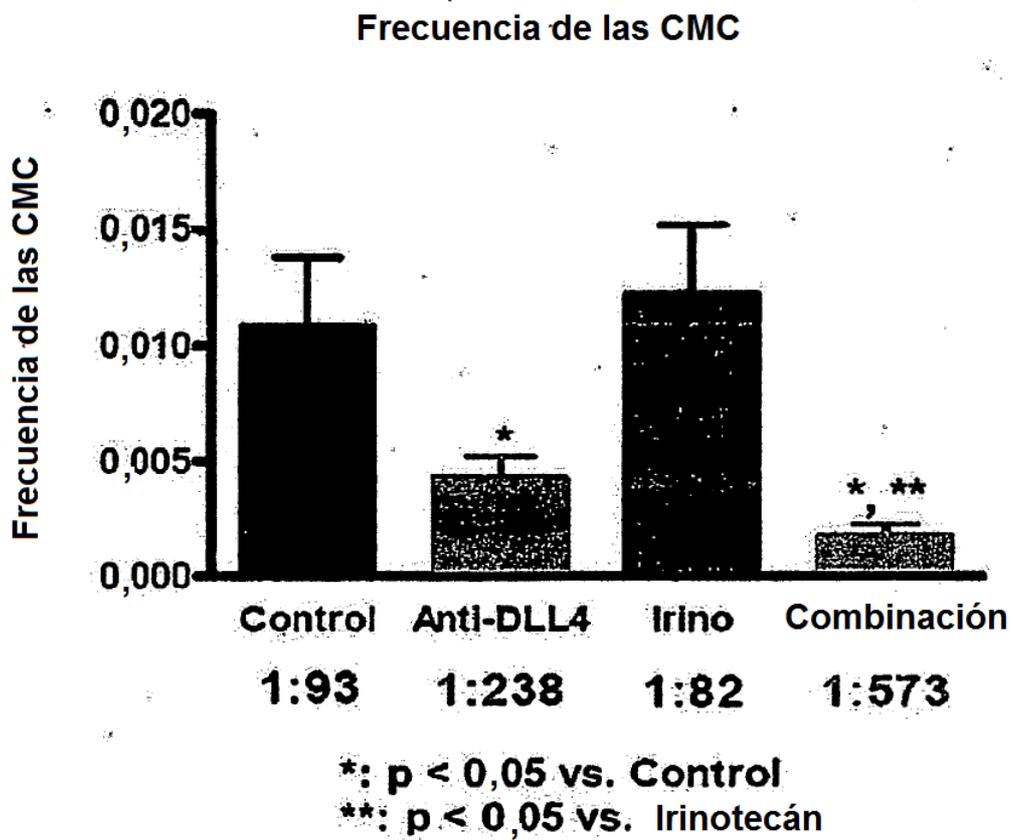


Figura 16

El tratamiento con anti-DLL4 21M18 retrasa la recurrencia del tumor tras el tratamiento de combinación con DLL4 e irinotecán

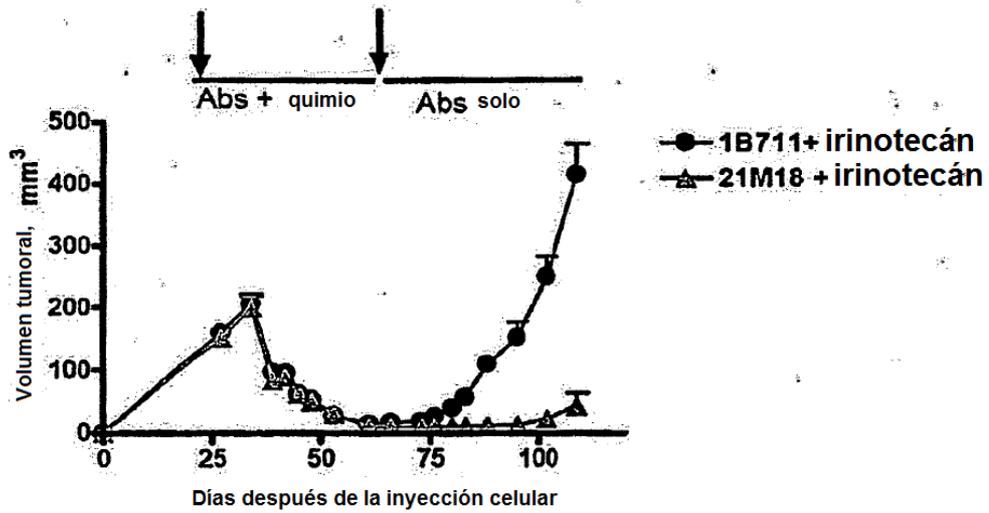


Figura 17

El tratamiento de combinación de 21M18 anti-DLL4-Irinotecán reduce el volumen tumoral 47 días después de finalizado el tratamiento

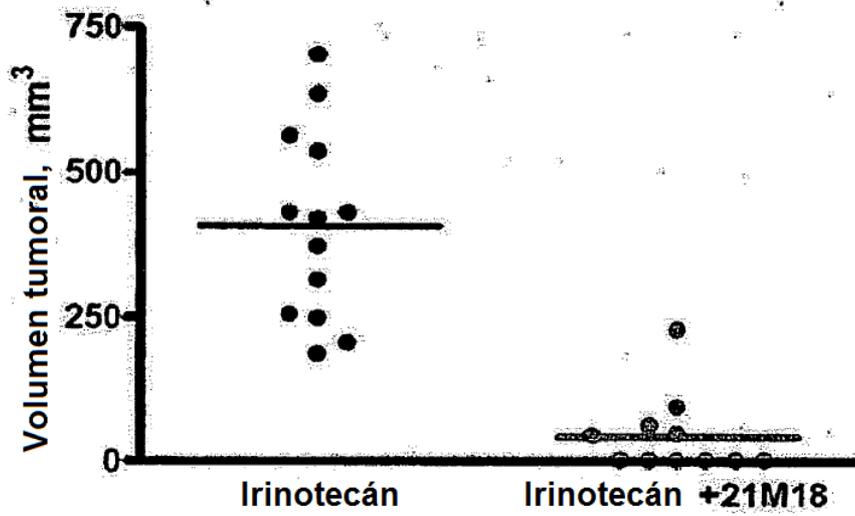


Figura 18

21M18 y anti-VEGF inhiben el crecimiento del tumor de colon

