

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 102**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2011 E 11733378 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2523682**

54 Título: **Agentes de unión a Notch1 y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410651 P

13.01.2010 US 294762 P

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

24.02.2016

73 Titular/es:

**ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063-4748, US**

72 Inventor/es:

VAN DER HORST, EDWARD THEIN HTUN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 561 102 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de unión a Notch1 y procedimientos de uso de los mismos

5 REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio prioritario de la solicitud provisional de EE. UU. con N.º 61/294.762, presentada el 13 de enero de 2010 y la solicitud provisional de EE. UU. con N.º 61/410.651, presentada el 5 de noviembre de 2010.

10

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] El campo de esta invención en general se refiere a anticuerpos y otros agentes que se unen a Notch1 humano, así como a procedimientos de uso de anticuerpos y otros agentes para el tratamiento de enfermedades hematológicas, especialmente enfermedades asociadas con la vía Notch.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La vía de señalización Notch es un sistema de transducción de señales conservado universalmente. Está implicada en la determinación del destino celular durante el desarrollo, lo que incluye la formación del patrón embrionario y el mantenimiento del tejido posembriionario. Asimismo, la señalización Notch se ha identificado como un factor crítico en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas.

20

[0004] La familia de receptores Notch de mamíferos incluye cuatro miembros: Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. Los receptores Notch son proteínas grandes transmembrana de tipo I con un único dominio transmembrana y varios motivos estructurales conservados. El dominio extracelular contiene un número variable de repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) implicadas en la unión del ligando y tres repeticiones LIN-12/Notch ricas en cisteína (LNR) implicadas en la heterodimerización de Notch. El dominio intracelular contiene un motivo RAM23 implicado en la unión de proteínas de señalización posteriores a Notch, 7 repeticiones cdc10/anquirina implicadas también en mediar en la señalización posterior y un dominio PEST implicado en la degradación de la proteína Notch.

25

30

[0005] Los ligandos de Notch en mamíferos son Delta-like 1 (DLL1), Delta-like 3 (DLL3), Delta-like 4 (DLL4), Jagged1 y Jagged2. De forma similar a los receptores Notch, los ligandos de Notch son proteínas transmembrana de tipo I con varios motivos estructurales conservados. Los motivos extracelulares comunes a todos los ligandos Notch incluyen un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) único implicado en la unión al receptor, así como un número variable de repeticiones similares a EGF que pueden estar implicadas en la estabilización de la unión al receptor. El dominio extracelular de las proteínas Jagged contiene una región rica en cisteínas con homología parcial con el dominio de tipo C del factor von Willebrand que está probablemente implicado en la dimerización del ligando. Este motivo no está presente en los miembros de la familia DLL (Leong y col., 2006, Blood, 107:2223-2233).

40

[0006] El dominio extracelular de un receptor Notch interactúa con el dominio extracelular de un ligando de Notch, normalmente en células adyacentes, dando lugar a dos escisiones proteolíticas del receptor Notch. Una escisión extracelular está mediada por una proteasa ADAM (desintegrina y metalopeptidasa) y una segunda escisión dentro del dominio transmembrana está mediada por el complejo gamma-secretasa gamma. Esta última escisión genera el dominio intracelular Notch (ICD), el cual se transloca al núcleo donde activa la familia CBF1/Supresor of Hairless, Lag-2 (CSL) de factores de transcripción como los principales efectores posteriores en la vía de señalización para incrementar la transcripción de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básicos nucleares de la familia Hairy/Enhancer of Split (HES) (Artavanis y col., 1999, Science, 284:770; Brennan y Brown, 2003, Breast Cancer Res., 5:69; Iso y col., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 23:543).

45

[0007] La vía Notch se ha asociado a la patogénesis de tumores y cánceres tanto hematológicos como sólidos. Se ha demostrado que numerosas funciones celulares y señales microambientales asociadas con la oncogénesis están moduladas por la vía de señalización Notch, incluyendo la proliferación celular, la apoptosis, la adhesión y la angiogénesis (Leong y col., 2006, Blood, 107:2223-2233). Asimismo, se ha demostrado que los receptores Notch y/o ligandos de Notch desempeñan posibles funciones oncogénicas en varios cánceres humanos, como la leucemia mielógena aguda, la leucemia linfocítica crónica de células B, el linfoma de Hodgkin, el mieloma múltiple, la leucemia linfoblástica aguda de células T, el cáncer de cerebro, el cáncer de mama, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata y el cáncer de piel (Leong y col., 2006, Blood, 107:2223-2233).

50

55

[0008] El gen Notch1 en humanos fue el primero que se identificó en un subgrupo de leucemias linfoblásticas agudas de células T como un locus translocado que daba lugar a la activación de la vía Notch (Ellisen y col., 1991, Cell, 66:649-61). Más recientemente se ha demostrado que más del 50% de las leucemias linfoblásticas agudas de células T tienen mutaciones de activación que afectan al dominio de heterodimerización extracelular y/o al dominio PEST c-terminal de Notch1 (Weng y col., 2004, Science, 306:269-271; Pear y Aster, 2004, Curr. Opin. Hematol., 11:416-33). La activación constitutiva de la señalización de Notch1 en células T en modelos murinos genera, de forma similar, linfomas de células T, lo que sugiere una función causal (Robey y col., 1996, Cell, 87:483-92; Pear y al., 1996, J. Exp. Med., 183:2283-91; Yan y col., 2001, Blood, 98:3793-9; Bellavia y col., 2000, EMBO J., 19:3337-48). Notch2 activado por retrovirus se ha asociado al linfoma tímico inducido por el virus de la leucemia felina (Rohn y col., 1996, J. Virology, 70:8071-8080). Se ha demostrado que las muestras de leucemia linfoblástica aguda de células T humana expresan Notch3 y su gen diana HES-1, que no se expresaba en células T periféricas normales ni en leucemias no de células T (Bellavia y col., 2002, PNAS, 99:3788-3793). De este modo, la vía Notch se ha identificado como una posible diana para la intervención terapéutica en varios cánceres hematológicos.

[0009] Se han descrito anticuerpos anti-Notch y su posible uso como agentes terapéuticos antineoplásicos. Véanse por ejemplo las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. N.º 2008/0131434 y 2009/0081238. Véanse también las publicaciones internacionales N.º WO 2008/057144, WO 2008/076960, WO 2008/150525, WO 2010/005566 y WO 2010/005567. El documento WO2008/057144 describe el dominio LNR-HD de Notch1 y Notch2 humanos y el documento WO 2008/150525 describe anticuerpos anti-Notch NRR.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La invención se define en las reivindicaciones. Aquellos aspectos/casos de la presente descripción que constituyen la invención se definen en las reivindicaciones.

RESUMEN DE LA DESCRIPCION

[0011] La presente descripción proporciona agentes de unión (p. ej., anticuerpos) que se unen específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 y composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden estos agentes. La descripción además proporciona procedimientos de uso de los agentes de unión en el tratamiento de un cáncer hematológico mediante la administración de los agentes a un sujeto que los necesita. En algunos casos, los procedimientos comprenden la inhibición del crecimiento de las células cancerosas. En algunos casos, el cáncer es un cáncer hematológico como una leucemia o un linfoma. En algunos casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el procedimiento para tratar cánceres hematológicos comprende la inhibición de la señalización de Notch1. En algunos casos, el procedimiento para tratar cánceres hematológicos comprende la inhibición de la activación de Notch1. En algunos casos, el procedimiento para tratar el cáncer o inhibir el crecimiento de células cancerosas comprende dirigirse a las células madre cancerosas con los agentes de unión. En algunos casos, las células madre cancerosas comprenden células iniciadoras de la leucemia. En algunos casos, los procedimientos comprenden la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en un sujeto, la reducción del número de células madre cancerosas en un sujeto, la reducción de la oncogenicidad de un cáncer y/o la reducción de la oncogenicidad de un cáncer mediante la reducción del número o frecuencia de células madre cancerosas en el sujeto.

[0012] En un aspecto, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el agente de unión es un anticuerpo. En algunos casos, el agente de unión es un anticuerpo que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que contiene RGYWIE (SEC ID N.º 15), una CDR2 de cadena pesada que contiene QILPGTGRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16) y/o una CDR3 de cadena pesada que contiene FDGNYGYYAMDY (SEC ID N.º 17); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que contiene RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18), una CDR2 de cadena ligera que contiene GTNNRAP (SEC ID N.º 19) y/o una CDR3 de cadena ligera que contiene ALWYSNHWWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20).

[0013] En determinados casos, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento de un cáncer hematológico

en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión (p. ej., un anticuerpo) que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano, en el que el agente de unión comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que contiene RGYWIE (SEC ID N.º 15) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada que contiene QILPGTGRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que contiene FDGNYGYYAMDY (SEC ID N.º 17) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En determinados casos, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) comprende (o además comprende) (a) una CDR1 de cadena ligera que contiene RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que contiene GTNNRAP (SEC ID N.º 19) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que contiene ALWYSNHWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T.

[0014] En determinados casos, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión (p. ej., un anticuerpo) que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano, en el que el agente de unión comprende: (a) una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% o el 100% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 14 o SEC ID N.º 24; y/o (b) una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% o el 100% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 28 o SEC ID N.º 32. En algunos casos, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 14 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 8. En algunos casos, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 28. En algunos casos, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 32. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es el anticuerpo 52M51. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es una forma humanizada del anticuerpo 52M51.

[0015] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 comprende las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del anticuerpo 52M51 (con o sin la secuencia señal/líder). En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es el anticuerpo 52M51. En algunos casos, Notch1 es una forma humanizada del anticuerpo 52M51. La línea celular del hibridoma que produce el anticuerpo 52M51 se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, EE. UU., según las condiciones del Tratado de Budapest, el 7 de agosto de 2008 y se le asignó el número de designación PTA-9405. En algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada del anticuerpo 52M51, 52M51H4L3, tal y como codifica el polinucleótido depositado en la ATCC, según las condiciones del Tratado de Budapest, el 15 de octubre de 2008 y se le asignó el número de designación PTA-9549.

[0016] En determinados casos de cada uno de los aspectos o casos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y/o casos descritos en otra parte de este documento, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 en el que la región proximal a la membrana de no unión al ligando de un receptor Notch1 contiene aproximadamente del aminoácido 1427 al aminoácido 1732 de un receptor Notch1 humano. En algunos casos, la región proximal a la membrana de un receptor Notch1 contiene al menos una parte de la SEC ID N.º 2. En algunos casos, la región proximal a la membrana de un receptor Notch1 contiene la SEC ID N.º 2. En determinados casos, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de al menos un receptor Notch adicional.

[0017] En algunos casos, la descripción proporciona un anticuerpo que se une específicamente al mismo epítipo o a un epítipo de Notch1 solapante con el epítipo al cual se une el anticuerpo 52M51.

[0018] En otro aspecto, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto que comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión (p. ej., un anticuerpo) que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano, en el que el agente de unión se une al mismo epítipo de la región proximal

a la membrana que el epítotope al cual se une el anticuerpo 52M51 producido por la línea celular del hibridoma depositado como Depósito de Patente ATCC PTA-9405. En algunos casos, el agente de unión compite con el anticuerpo 52M51 por la unión específica a la región proximal a la membrana de Notch1. En algunos casos, el agente de unión compite con el anticuerpo 52M51 por la unión específica a la región proximal a la membrana de no unión al ligando de Notch1 que contiene al menos una parte de la SEC ID N.º 2. En algunos casos, el agente de unión compite con el anticuerpo 52M51 por la unión específica a un epítotope dentro de la región proximal a la membrana de no unión al ligando de Notch1 que contiene la SEC ID N.º 2. En algunos casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T.

10

[0019] En otro aspecto, la descripción proporciona procedimientos de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico que comprenden poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un agente de unión (p. ej., un anticuerpo) que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular del receptor Notch1 humano y en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que contiene RGYWIE (SEC ID N.º 15), una CDR2 de cadena pesada que contiene QILPGTGRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16) y una CDR3 de cadena pesada que contiene FDGNYGYYAMDY (SEC ID N.º 17); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que contiene RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18), una CDR2 de cadena ligera que contiene GTNNRAP (SEC ID N.º 19) y una CDR3 de cadena ligera que contiene ALWYSNHWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20). En algunos casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T.

[0020] En determinados casos de cada uno de los aspectos o casos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y/o casos descritos en otra parte de este documento, el agente de unión es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinados casos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es monovalente, monoespecífico, bivalente, biespecífico o multiespecífico. En determinados casos, el anticuerpo se conjuga con un resto citotóxico. En determinados casos, el anticuerpo está aislado. Aún en casos adicionales, el anticuerpo está sustancialmente puro.

[0021] También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de unión (p. ej., anticuerpos) que se unen específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular del receptor Notch1 humano para su uso en procedimientos de tratamiento de los cánceres hematológicos descritos en este documento. En determinados casos, las composiciones farmacéuticas además comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0022] En determinados casos de cada uno de los aspectos o casos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y/o casos descritos en otra parte de este documento, el agente de unión (p. ej., un anticuerpo) es un agonista de Notch1. En algunos casos, el agente de unión inhibe la señalización de Notch1. En algunos casos, el agente de unión inhibe la activación de Notch1. En algunos casos, el agente de unión inhibe la actividad Notch1. En algunos casos, el agente de unión inhibe la actividad de un Notch1 activado constitutivamente. En algunos casos, el agente de unión inhibe la escisión de la región proximal a la membrana. En determinados casos, el agente de unión inhibe la escisión de Notch1 (p. ej., la escisión en el sitio S2 por una metaloproteasa) y/o inhibe la activación de Notch1 mediante la unión al ligando. En algunos casos, el agente de unión inhibe la liberación o formación del dominio intracelular (ICD) de Notch1. En determinados casos, el agente de unión inhibe el crecimiento de las células del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión inhibe el crecimiento de las células de leucemia linfoblástica aguda de células T.

50

[0023] En un aspecto adicional, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de Notch1 en una célula de cáncer hematológico, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz de cualquier de los anticuerpos o polipéptidos descritos en los aspectos y casos mencionados anteriormente, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier otra parte de este documento. En determinados casos, la célula de cáncer hematológico es una célula de leucemia linfoblástica aguda de células T.

[0024] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de un cáncer hematológico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en los aspectos y casos

- mencionados anteriormente, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier otra parte de este documento. En algunos casos, el cáncer hematológico comprende células madre cancerosas. En algunos casos, el cáncer hematológico comprende células iniciadoras de leucemia. En algunos casos, los procedimientos comprenden dirigirse a las células madre cancerosas con los agentes de unión y los anticuerpos descritos en este documento. En
- 5 determinados casos, los procedimientos comprenden la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en un cáncer hematológico, la reducción del número de células iniciadoras de leucemia en un cáncer hematológico, la reducción del número de células madre cancerosas en un cáncer hematológico, la reducción de la oncogenicidad de un cáncer hematológico y/o la reducción de la oncogenicidad de un cáncer hematológico mediante la reducción del número o frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer hematológico. En algunos casos, los procedimientos
- 10 comprenden la inhibición de la actividad de Notch1 y/o la inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico. En determinados casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En determinados casos, la célula de cáncer hematológico es una célula de leucemia linfoblástica aguda de células T.
- 15 **[0025]** En un aspecto adicional, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de un cáncer hematológico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano, en el que la unión inhibe la actividad de Notch1. En algunos casos, los procedimientos comprenden la inhibición de la actividad de un Notch1 activado constitutivamente.
- 20 **[0026]** En un aspecto más, la descripción proporciona un procedimiento para reducir la oncogenicidad de un cáncer hematológico que comprende células madre cancerosas mediante la reducción de la frecuencia o el número de células madre cancerosas en el cáncer, comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un agente de unión o un anticuerpo, como se describe en este documento, que inhibe la actividad
- 25 de Notch1.
- [0027]** En determinados casos de cada uno de los aspectos y/o casos mencionados anteriormente, así como otros aspectos o casos descritos en este documento, los procedimientos además comprenden la administración al sujeto de al menos un agente terapéutico adicional. En determinados casos de cada uno de los aspectos o casos
- 30 mencionados anteriormente, así como otros aspectos y/o casos descritos en cualquier otra parte de este documento, el anticuerpo o polipéptido se administra a un sujeto en combinación con un tratamiento adicional para un cáncer hematológico. En determinados casos, el tratamiento adicional para un cáncer hematológico comprende radioterapia, quimioterapia y/o un anticuerpo terapéutico adicional.
- 35 **[0028]** La descripción además proporciona un procedimiento para tratar un cáncer hematológico en un humano, en el que el cáncer hematológico que comprende células madre cancerosas no se caracteriza por la sobreexpresión de uno o más receptores Notch por las células madre cancerosas, que comprende la administración al humano de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión o un anticuerpo que se une a una región proximal a la
- 40 membrana del dominio extracelular de Notch1 y bloquea la activación de Notch1 por el ligando. En algunos casos, los agentes de unión o los anticuerpos como se describen en este documento se administran para tratar un cáncer hematológico, en el que el cáncer hematológico se caracteriza por un Notch1 activado constitutivamente.
- [0029]** La descripción además proporciona un procedimiento para tratar un cáncer hematológico en un humano que comprende la administración al humano de cantidades terapéuticamente eficaces de (a) un primer anticuerpo que se
- 45 une a Notch1 e inhibe el crecimiento de células madre cancerosas que sobreexpresan Notch1; y (b) un segundo anticuerpo que se une a un receptor Notch y bloquea la activación mediada por el ligando de un receptor Notch. En algunos casos, el procedimiento comprende la administración al humano de cantidades terapéuticamente eficaces de (a) un primer anticuerpo que se une a Notch1 e inhibe el crecimiento de células madre cancerosas que sobreexpresan Notch1; y (b) un segundo anticuerpo que se une a VEGF.
- 50 **[0030]** En casos adicionales, la descripción proporciona artículos de fabricación para su uso (entre otras cosas) en los procedimientos anteriores. Por ejemplo, la descripción proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en él, en el que la composición contiene un anticuerpo que se une a Notch y además contiene un prospecto indicando que la composición se puede usar para tratar un cáncer que comprende
- 55 células madre cancerosas. En algunos casos, la descripción proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en él, en el que la composición contiene un anticuerpo que se une a Notch y, además, contiene un prospecto indicando que la composición se puede usar para tratar un cáncer que comprende células madre cancerosas que expresan uno o más receptores Notch.

[0031] En ciertos casos, la descripción se refiere adicionalmente a un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en él, en el que la composición comprende un anticuerpo que se une a un receptor Notch y bloquea la activación mediada por ligando de un receptor Notch y, además, comprende un prospecto indicando que la composición se puede usar para tratar el cáncer, en el que el cáncer comprende células madre cancerosas que no se caracterizan por la sobreexpresión del receptor Notch.

[0032] En determinados casos, se proporciona un artículo de fabricación que comprende (a) un primer recipiente con una composición contenida en él, en el que la composición comprende un primer anticuerpo que se une a un receptor Notch e inhibe el crecimiento de células cancerosas que comprenden células madre cancerosas que sobreexpresan Notch; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en él, en el que la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a Notch y bloquea la activación mediada por ligando de un receptor Notch.

[0033] En algunos casos, se proporciona un artículo de fabricación adicional que comprende un recipiente y una composición contenida en él, en el que la composición comprende un anticuerpo que se une a Notch y bloquea la activación mediada por ligando de un receptor Notch y, además, comprende un prospecto indicando que la composición se puede usar para tratar un cáncer seleccionado a partir del grupo compuesto por leucemia mielógena aguda, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple y leucemia linfoblástica aguda de células T.

[0034] La descripción proporciona adicionalmente: un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado) que se une a Notch y bloquea la activación mediada por ligando de un receptor Notch; una composición que comprende el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y un inmunocombinado que comprende el anticuerpo combinado con un agente citotóxico.

[0035] En un aspecto, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de los aspectos o casos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y/o casos descritos en cualquier otra parte de este documento. En algunos casos, la descripción proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En algunos casos, una célula huésped contiene el polinucleótido o el vector. En otros casos, un proceso para producir el anticuerpo comprende el cultivo de una célula huésped que contiene el polinucleótido de modo que se expresa el polinucleótido y, opcionalmente, comprende además la recuperación del anticuerpo a partir del cultivo de la célula huésped (p. ej., a partir del medio de cultivo de la célula huésped).

[0036] Asimismo, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo humanizado o humano como se describe en los casos o aspectos mencionados anteriormente, así como se describe en cualquier otra parte de este documento; un vector que contiene el polinucleótido; una célula huésped que contiene el polinucleótido o el vector; así como un proceso de producción del anticuerpo que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene el polinucleótido de modo que el polinucleótido se exprese y, opcionalmente, comprende además la recuperación del anticuerpo a partir del cultivo de la célula huésped (p. ej., a partir del medio de cultivo de la célula huésped).

[0037] La descripción además se refiere a un inmunocombinado que comprende un anticuerpo que se une a Notch combinado con una o más moléculas de caliquemicina y el uso de dichos combinados para tratar un cáncer que expresa Notch, por ejemplo, un cáncer en el que las células madre cancerosas sobreexpresan Notch.

[0038] Cuando los aspectos o casos de la descripción se describen en términos de un grupo Markush u otras agrupaciones alternativas, incluyendo, pero sin limitaciones, los grupos de alternativas separadas por «y/o» u «o», la presente descripción abarca no solo el grupo completo indicado como un todo, sino también cada uno de los miembros del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal y además el grupo principal con la ausencia de uno o más de los miembros del grupo. La presente descripción también contempla la exclusión explícita de uno o más de los miembros del grupo en la descripción reivindicada. Por ejemplo, expresiones como «X y/o Y» abarcan «X» individualmente, «Y» individualmente, así como «X» e «Y» juntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0039]

Figura 1: Identificación de anticuerpos dirigidos a la región proximal a la membrana de Notch que inhibe la señalización de Notch. (A) Esquema del receptor Notch y región del antígeno 52M. El antígeno 52M incluye la zona del receptor Notch1 sujeto a escisión por furina durante la maduración del receptor y escisión por proteasas ADAM (desintegrina y

metaloproteasa) tras la unión del ligando. El procesamiento posterior con gamma-secretasa causa la liberación del dominio intracelular (ICD) de Notch que activa la transcripción génica en el núcleo. (B) Niveles de luciferasa (eje Y) derivados de células Notch1-HeLa cultivadas en presencia de un ligando soluble de Notch (hDLL4-Fc) y anticuerpos frente al receptor Notch1. Los resultados de células no transfectadas (NT) con y sin hDLL4-Fc se muestran en la parte izquierda más alejada del eje X. Los anticuerpos anti-52M Notch1 se muestran a lo largo del eje X y se comparan con DBZ, un inhibidor de la gamma-secretasa de Notch, y 21M18, un anticuerpo anti-DLL4. Los anticuerpos anti-Notch1 52M51, 52M63, 52M74 y 52M80 inhibían todos significativamente la señalización de Notch como indica la disminución de la actividad luciferasa. (C) Niveles de luciferasa (eje Y) derivados de células Notch1-HeLa cultivadas en presencia de un ligando soluble de Notch (hDLL4-Fc) y anticuerpos frente al receptor Notch1. Los resultados de células no transfectadas (NT) con y sin hDLL4-Fc se muestran en la parte izquierda más alejada del eje X. El anticuerpo derivado del hibridoma murino 52M51 y de la variante humanizada 52M51H4L3 se muestran a lo largo del eje X en diferentes concentraciones como se indica. Tanto el anticuerpo murino parental 52M51 como la variante humanizada inhiben significativamente la señalización de Notch como indica la disminución en la actividad luciferasa. (D) Análisis mediante inmunotransferencia de la formación del ICD después de la estimulación mediada por ligando de células HeLa que expresan Notch1. En ausencia del ligando DLL4 (-DLL4) se produce un ICD mínimo, pero su formación es estimulada por la presencia de DLL4. Los anticuerpos 52M51, 52M63, 52M74 y 52M80 redujeron la formación de ICD a niveles de fondo a pesar de la presencia de DLL4.

Figura 2: Evaluación de los anticuerpos anti-Notch1 en un modelo de xenoinjerto de leucemia. Los ratones NOD/SCID se preconditionaron con 10×10^6 células mononucleares de médula ósea tras la irradiación. Varios días después, se inyectaron a los ratones 5×10^6 células de leucemia linfoblástica aguda de células T primarias. Cinco semanas después se inyectaron las células de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), se sacrificaron los ratones y se analizaron los injertos de T-ALL en las células aisladas de los bazo mediante citometría de flujo. El análisis mediante citometría de flujo se realizó usando anticuerpos monoclonales específicos frente a CD45 y CD34 humanos. La fracción de células con tinción positiva para los anticuerpos se determinó usando el software Tree Star FlowJo. La significación se calculó mediante la prueba t de Student usando el software GraphPad Prism. Se indica el porcentaje de células CD45+ y CD34+ humanas en los bazo de los ratones. *** Representa una significación de $p < 0,001$ en comparación con el anticuerpo control LZ-1.

Figura 3: Evaluación *in vitro* de la inhibición de Notch1 en células HPB-ALL. Las células HPB-ALL se dispusieron en placas de 96 pocillos y se trataron con el anticuerpo 52M51 anti-Notch1 (-■-), un anticuerpo control (-▼-) o con dibenzacepina (DBZ) (-●-). Los datos se muestran como unidades relativas de luz (URL).

Figura 4: Evaluación *in vitro* de la inhibición de Notch1 sobre la proliferación de células HPB-ALL. Las células HPB-ALL se incubaron en presencia de $12 \mu\text{M}$ de DBZ, $100 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 52M51 anti-Notch1 o $100 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo control. Se analizó en las células la proteína K167 mediante citometría de flujo.

Figura 5: Evaluación *in vitro* de la inhibición de Notch1 sobre la formación del ICD. Las células HPB-ALL se incubaron en presencia de $12 \mu\text{M}$ de DBZ, $100 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 52M51 anti-Notch1 o $100 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo control. Los extractos de proteína celular total se separaron mediante PAGE en presencia de SDS y se evaluaron mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo específico para el ICD de Notch1.

Figura 6: Inhibición del crecimiento tumoral de HPB-ALL *in vivo* por el anticuerpo anti-Notch1. Las células HPB-ALL se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD/SCID. Los ratones se trataron con anticuerpo control (-■-) o con el anticuerpo 52M51 anti-Notch1 (-▼-). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm^3) frente a los días postratamiento. Los anticuerpos se administraron a 15 mg/kg una vez a la semana.

Figura 7: Evaluación de los anticuerpos anti-Notch1 en un modelo de xenoinjerto de leucemia diseminada. Se inyectaron las células HPB-ALL en la vena de la cola de ratones NOD/SCID. Un día después de la inyección, los animales fueron tratados con un anticuerpo control o con el anticuerpo anti-Notch1 52M51. Aproximadamente 5 semanas después los ratones fueron sacrificados y se analizó la presencia de células HPB-ALL en bazo, sangre periférica y médula ósea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DESCRIPCIÓN

[0040] La presente descripción proporciona agentes novedosos que incluyen, pero sin limitaciones, polipéptidos tales como anticuerpos que se unen a uno o más receptores Notch humanos, especialmente Notch1. Los agentes de unión a Notch incluyen antagonistas de Notch1 humano. También se proporcionan polipéptidos y polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden agentes de unión a Notch y procedimientos para obtener los agentes

de unión a Notch. Adicionalmente se proporcionan procedimientos para usar los agentes nuevos de unión a Notch, tales como procedimientos de inhibición del crecimiento de cánceres hematológicos y/o de tratamiento de cánceres hematológicos.

5 **[0041]** La presente descripción además identifica moléculas (p. ej., anticuerpos) que se unen específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano y que inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. La región de unión a ligando de Notch, que es necesaria y suficiente para la unión del ligando, se ha identificado como las repeticiones 11 y 12 de EGF, lo que sugiere que esta región del receptor Notch es importante en la señalización y oncogénesis de Notch (Rebay y col., 1991, Cell, 67:687; Lei y col., 2003, Dev.,
10 130:6411; Hambleton y col., 2004, Structure, 12:2173). Inesperadamente, se ha encontrado que los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión al ligando del dominio extracelular del receptor Notch humano inhiben el crecimiento de células tumorales *in vivo* (véase la publicación de patente de EE. UU. N.º 2008/0131434 y la publicación internacional N.º WO 2010/005567). De este modo, los anticuerpos que se unen fuera del dominio de unión al ligando del dominio extracelular de uno o más receptores Notch humanos (Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4) tienen valor
15 como posibles agentes terapéuticos contra el cáncer.

[0042] Se han identificado anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1, lo que incluye el anticuerpo monoclonal 52M51 (ejemplo 1). Se han generado anticuerpos 52M51 humanizados (ejemplo 2). Varios anticuerpos, incluidos 52M51 y la variante humanizada de 52M51, inhiben la señalización de Notch1 inducida por ligando (ejemplo 3 y figura 1B y C), a pesar de la unión a Notch1 en una región fuera de la región de unión a ligando. Se ha demostrado la capacidad de varios de los anticuerpos para inhibir la formación del dominio intracelular (ICD) de Notch (ejemplos 3 y 7; figuras 1D y 5). Se ha demostrado que 52M51 inhibe el crecimiento de tumores sólidos de células HPB-ALL (ejemplo 8 y figura 6). Se ha demostrado que 52M51 reduce la viabilidad y proliferación celular de células de leucemia humana *in vitro* (ejemplos 5 y 6; figuras 3 y
25 4). Se ha encontrado que 52M51 inhibe el injerto de células leucémicas *in vivo* en dos modelos de xenoinjerto (ejemplos 4 y 9; figuras 2 y 7).

I. Definiciones

30 **[0043]** Para facilitar el entendimiento de la presente descripción, a continuación se definen varios términos y expresiones.

[0044] El término «antagonista» según se usa en este documento se refiere a cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente la actividad de la vía de Notch. El término «antagonista» se usa en este documento para incluir a cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente la expresión de un receptor Notch. Moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo antagonistas.

[0045] El término «anticuerpo» según se usa en este documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, como por ejemplo una proteína, polipéptido, péptido, hidrato de carbono, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Según se usa en este documento, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos como
45 anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que contienen una porción del determinante antigénico de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de
50 inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), según la identidad de los dominios constantes de su cadena pesada denominados alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar tal cual o conjugados con otras moléculas, incluyendo, pero sin limitaciones, toxinas y radioisótopos.

55 **[0046]** El término «fragmento de anticuerpo» se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, pero sin limitaciones, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0047] El término «región variable» de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones armazón (FR, del inglés *framework region*) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), conocidas también como «regiones hipervariables». Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad gracias a las regiones armazón y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Se conocen al menos dos técnicas para la determinación de los CDR: (1) una estrategia basada en la variabilidad de secuencia cruzada entre especies (es decir, Kabat y col., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda Md.) y (2) una estrategia basada en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-Lazikani y col., 1997, *J. Molec. Biol.*, 273:927-948). Además, a veces se utilizan en la técnica combinaciones de estas dos estrategias para determinar las CDR.

[0048] El término «anticuerpo monoclonal» según se usa en este documento se refiere a una población homogénea de anticuerpos implicada en el reconocimiento altamente específico y unión de un determinante antigénico o epítipo único. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término «anticuerpo monoclonal» abarca anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, así como fragmentos antigénicos (p. ej., Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que contienen una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que contenga un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, «anticuerpo monoclonal» se refiere a tales anticuerpos fabricados mediante cualquiera de las técnicas, incluyendo, pero sin limitaciones, la producción de hibridomas, la selección de fagos, la expresión de moléculas recombinantes y animales transgénicos.

[0049] El término «anticuerpo humanizado» según se usa en este documento se refiere a formas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas.

[0050] El término «anticuerpo humano» según se usa en este documento se refiere a 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 cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que contienen al menos un polipéptido de cadena pesada y/o cadena ligera humana, por ejemplo, un anticuerpo que contiene polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana.

[0051] El término «anticuerpo quimérico» según se usa en este documento se refiere a un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas se corresponde con la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamífero (p. ej., ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra especie (generalmente humano) para evitar activar una respuesta inmune en esa especie.

[0052] Los términos «epítipo» y «determinante antigénico» se usan indistintamente en este documento y se refieren a la porción de un antígeno capaz de ser reconocida por un anticuerpo en particular y unirse específicamente a este. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopes pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos debido al plegamiento terciario de una proteína. Los epítopes formados por aminoácidos contiguos (denominados también epítopes lineales) normalmente se conservan tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítopes formados por el plegamiento terciario (denominados también epítopes conformacionales) normalmente se pierden tras la desnaturalización de la proteína. Típicamente, un epítipo incluye al menos 3, y normalmente más, al menos 5, u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial exclusiva.

[0053] Las expresiones «se une selectivamente» o «se une específicamente» significan que un agente de unión o un anticuerpo reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de lo anterior al epítipo, proteína o molécula diana que con sustancias alternativas, incluidas proteínas no relacionadas. En determinados casos, «se une específicamente» significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D de aproximadamente 0,1 mM o menos, pero más normalmente menos de aproximadamente 1 μ M. En determinados casos, «se une específicamente» significa que un anticuerpo se une a una diana en ocasiones con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 μ M o menos y en otras ocasiones de al menos 0,01 μ M o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas de diferentes especies, la unión

específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína (p. ej., un receptor Notch) en más de una especie. Del mismo modo, debido a la homología dentro de determinadas regiones de las secuencias polipeptídicas de diferentes proteínas, la unión específica puede incluir un anticuerpo (u otro polipéptido o agente de unión) que reconoce más de una proteína (p. ej., Notch1 humano y Notch2 humano). Se entiende que, en determinados casos, un anticuerpo o resto de unión que se une específicamente a una primera diana puede o no unirse específicamente a una segunda diana. Así pues, «unión específica» no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, es decir, la unión a una única diana. De este modo, un anticuerpo puede, en determinados casos, unirse específicamente a más de una diana (p. ej., Notch1 humano, Notch2 humano, Notch3 humano y/o Notch de ratón). En determinados casos, se puede unir a múltiples dianas por el mismo sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede, en determinados casos, contener dos sitios de unión a antígeno idénticos, cada uno de los cuales se une específicamente al mismo epítipo en dos o más proteínas (p. ej., Notch1 y Notch2). En determinados casos alternativos, un anticuerpo puede ser biespecífico y contener al menos dos sitios de unión a antígeno con especificidades diferentes. A modo de ejemplo no limitante, un anticuerpo biespecífico puede contener un único sitio de unión a antígeno que reconoce un epítipo en una única proteína (p. ej., Notch1 humano) y además contiene un segundo sitio de unión a antígeno diferente que reconoce un epítipo diferente en una segunda proteína (p. ej., Notch2 humano). Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión específica.

[0054] Los términos «polipéptido», «oligopéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por restos no aminoacídicos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de puente disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como conjugación con un componente de marcaje. En la definición también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, puesto que los polipéptidos de esta descripción están basados en aminoácidos, en determinados casos, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

[0055] Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico» se usan en este documento indistintamente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante la ADN o ARN polimerasa.

[0056] Se pueden identificar «condiciones muy rigurosas» mediante: (1) el empleo de baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) el empleo de un agente desnaturizante durante la hibridación, como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) el empleo de formamida al 50%, SSCx5 (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de Denhardt x5, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en SSCx0,2 (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado en condiciones muy rigurosas compuesto por SSCx0,1 que contiene EDTA a 55°C.

[0057] Los términos «idéntico» o porcentaje de «identidad» en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje especificado de restos de nucleótidos o aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede determinar usando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Son bien conocidos en la técnica varios algoritmos y software que se pueden usar para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Esto incluye, pero sin limitaciones, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, etc. En algunos casos, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la descripción son sustancialmente idénticos, lo que significa que tiene al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% y, en algunos casos, al menos el 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de restos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se compara y alinea para la máxima correspondencia, determinado usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En algunos casos, existe identidad sobre una región de las secuencias que es de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40-60 restos de longitud o cualquier valor entero entre ellos. En algunos casos, existe identidad en una región más larga de 60-80 restos, como al menos aproximadamente 90-100 restos y, en algunos casos, las secuencias son sustancialmente

idénticas en la longitud completa de las secuencias que se están comparando, como la región codificadora de una secuencia de nucleótidos.

[0058] Una «sustitución de aminoácidos conservadora» es aquella en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido con una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de restos de aminoácidos con cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. Preferiblemente, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la descripción no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno o antígenos, es decir, la proteína o proteínas Notch a las cuales se une el polipéptido o el anticuerpo. Se conocen bien en la técnica los procedimientos de identificación de sustituciones conservadoras de nucleótidos o aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno.

[0059] El término «vector» según se usa en este documento significa una construcción que es capaz de administrar y, normalmente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitaciones, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

[0060] Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está «aislado» es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Entre los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados se incluyen aquellos que se han purificado hasta un grado tal que ya no es una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos casos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislado está sustancialmente puro.

[0061] El término «sustancialmente puro» según se usa en este documento se refiere al material que está al menos el 50% puro (es decir, libre de contaminantes), al menos el 90% puro, al menos el 95% puro, al menos el 98% puro o al menos el 99% puro.

[0062] Los términos «cáncer» y «canceroso» según se usan en este documento se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos en la que una población de células se caracteriza por el crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitaciones, carcinoma, blastoma, sarcoma y cánceres hematológicos como linfoma y leucemia.

[0063] Los términos «tumor» y «neoplasia» según se usan en este documento se refieren a cualquier masa de tejido que es el resultado del crecimiento o proliferación celular excesivo, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso), incluidas lesiones precancerosas.

[0064] Los términos «trastorno proliferativo» y «enfermedad proliferativa» se refieren a trastornos asociados con una proliferación celular anómala como el cáncer.

[0065] El término «metástasis» según se usa en este documento se refiere al proceso por el cual un cáncer se disemina o transfiere desde el sitio de origen a otras regiones del organismo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva localización. Una célula «metastásica» o «metastatizante» es aquella que pierde los contactos de adherencia con las células vecinas y migra a través del torrente sanguíneo o la linfa desde el sitio primario de la enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.

[0066] Los términos «célula madre cancerosa», «CMC» y «célula madre tumoral» se usan indistintamente en este documento y se refieren a células procedentes de un cáncer que: 1) tienen capacidad proliferativa extensa; 2) son capaces de divisiones celulares asimétricas para generar una o más clases de progenie diferenciada con reducido potencial proliferativo o de desarrollo y 3) son capaces de divisiones celulares simétricas para la autorrenovación o automantenimiento. Estas propiedades confieren a las células madre cancerosas la capacidad de formar o establecer un tumor o cáncer tras el trasplante en serie en un huésped inmunocomprometido (p. ej., un ratón) en comparación con la mayoría de células tumorales que no pueden formar tumores. Las células madre cancerosas sufren autorrenovación frente a diferenciación de una forma caótica para formar tumores con tipos de células anómalos que pueden cambiar con el tiempo cuando se producen mutaciones. La «célula madre cancerosa» según se usa en este

documento puede comprender células iniciadoras de leucemia.

- [0067]** Los términos «célula cancerosa» y «célula tumoral» se refieren a la población total de células derivadas de un cáncer, tumor o lesión precancerosa, lo que incluye tanto células no oncógenas, que comprenden la masa de la población de células cancerosas, como células madre oncógenas (células madre cancerosas). Según se usa en este documento, los términos «célula cancerosa» o «célula tumoral» se modificarán por el término «no oncógeno» cuando se refieran exclusivamente a aquellas células que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguirlas de aquellas células tumorales procedentes de células madre cancerosas.
- 10 **[0068]** El término «oncógeno» según se usa en este documento se refiere a las características funcionales de una célula madre cancerosa que incluyen las propiedades de autorrenovación (que dan lugar a células madre cancerosas oncógenas adicionales) y proliferación para generar todas las demás células tumorales (que dan lugar a células tumorales diferenciadas y, por tanto, no oncógenas).
- 15 **[0069]** El término «oncogenicidad» según se usa en este documento de un tumor se refiere a la capacidad de una muestra aleatoria de células del tumor para formar tumores palpables tras el trasplante en serie en huéspedes inmunocomprometidos (p. ej., ratones).
- [0070]** El término «sujeto» se refiere a cualquier animal (p. ej., un mamífero), incluyen, pero sin limitaciones, humanos, primates no humanos, cánidos, felinos, roedores y similares, que son receptores de un tratamiento en particular. Normalmente, los términos «sujeto» y «paciente» se usan indistintamente en este documento en referencia a un sujeto humano.
- 20 **[0071]** El término «farmacéuticamente aceptable» significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno Federal o Estatal o incluido en la Farmacopea de los EE. UU. o en otra farmacopea generalmente reconocida, para su uso en animales incluido humanos.
- [0072]** Los términos «excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable» o «vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a un excipiente, vehículo o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con al menos un agente de unión (p. ej., un anticuerpo) de la presente descripción y que no destruye la actividad farmacológica del mismo ni es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para proporcionar un efecto terapéutico.
- 30 **[0073]** Los términos «cantidad eficaz», «cantidad terapéuticamente eficaz» o «efecto terapéutico» se refieren a una cantidad de un agente de unión, un anticuerpo, un polipéptido, un polinucleótido, una molécula orgánica pequeña u otro fármaco eficaz para «tratar» una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco (p. ej., un anticuerpo) tiene un efecto terapéutico y como tal puede reducir el número de células cancerosas; disminuir la oncogenicidad, frecuencia oncógena o capacidad oncógena; reducir el número o frecuencia de células madre cancerosas; reducir el tamaño del tumor; reducir la población de células cancerosas; inhibir o detener la infiltración de células cancerosas dentro de órganos periféricos que incluye, por ejemplo, la diseminación del cáncer dentro del tejido blando y del hueso; inhibir y detener la metástasis de células tumorales o cancerosas; inhibir y detener el crecimiento de células tumorales o cancerosas; aliviar hasta cierto 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 dichos efectos. Según el grado en que el agente, por ejemplo un anticuerpo, previene el crecimiento y/o mata las células cancerosas existentes, se puede denominar citostático y/o citotóxico.
- 45 **[0074]** Los términos «tratando», «tratamiento», «tratar», «aliviando» o «aliviar» se refieren a 1) medidas terapéuticas que curan, retardan o reducen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección patológica o trastorno diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen o ralentizan el desarrollo de una afección patológica o trastorno objetivo. Por tanto, aquellos que necesitan tratamiento son los que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno y aquellos en los que el trastorno se desea prevenir. En algunos casos, un sujeto es «tratado» con éxito según los procedimientos de la presente descripción si el paciente muestra uno o más de los siguientes efectos: una reducción del número o ausencia completa de células cancerosas; una reducción del tamaño del tumor; una inhibición o ausencia de infiltración de células cancerosas dentro de órganos periféricos incluyendo la diseminación de las células cancerosas dentro del tejido blando o el hueso; una inhibición o ausencia de metástasis de células tumorales o cancerosas; una inhibición o ausencia de crecimiento del cáncer; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas; mejora de la calidad de vida; reducción de la oncogenicidad; reducción del número o frecuencia de células madre cancerosas; o algunas combinaciones de efectos.
- 50
55

[0075] Según se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares «un», «una» y «el», «la» incluyen las formas plurales salvo que el contexto dicte claramente lo contrario.

5 **[0076]** Se entiende que siempre que se describen casos en este documento con la expresión «que comprende» o «que contiene», también se proporcionan casos por lo demás análogos descritos en términos de «que consta de» y/o «que consta esencialmente de».

10 **[0077]** El término «y/o» según se usa en un frase como «A y/o B» en este documento pretende incluir: tanto A como B; A o B; A (solo) y B (solo). Del mismo modo, el término «y/o» según se usa en una frase como «A, B y/o C» pretende abarcar cada uno de los siguientes casos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo) y C (solo).

II. Agentes de unión a Notch1

15

[0078] La presente descripción proporciona agentes que se unen específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano, composiciones que comprenden aquellos agentes de unión y procedimientos para el uso de estos agentes de unión para tratar cánceres hematológicos. En particular, en determinados casos, la presente descripción proporciona agentes, incluidos antagonistas que se unen a Notch1 y procedimientos para usar los agentes o antagonistas para inhibir el crecimiento del cáncer y tratar el cáncer u otras enfermedades en pacientes humanos. En determinados casos, los antagonistas son anticuerpos que se unen específicamente a una región de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano.

25 **[0079]** En un aspecto, la presente descripción proporciona un agente de unión que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el agente de unión es un anticuerpo. En algunos casos, el agente de unión o anticuerpo se une a una región de Notch1 humano que contiene aproximadamente del aminoácido 1427 al aminoácido 1732. En algunos casos, el agente de unión o el anticuerpo se une a una región que contiene la SEC ID N.º 2. En algunos casos, el agente de unión o el anticuerpo se une específicamente a una región dentro de la SEC ID N.º 2. En algunos casos, el agente de unión o el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de una región que contiene la SEC ID N.º 2. En determinados casos, el agente de unión o el anticuerpo que se une a Notch1 también se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de al menos un receptor Notch adicional. En algunas casos, el al menos un receptor Notch adicional es Notch2. En algunas casos, el al menos un receptor Notch adicional es Notch3. En algunas casos, el al menos un receptor Notch adicional es Notch4.

35

[0080] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es un polipéptido. En determinados casos, el polipéptido o el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En determinados casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En determinados casos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En determinados casos, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinados casos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

45 **[0081]** En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) se une a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos o aproximadamente 1 nM o menos. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 o anticuerpo se une al Notch1 humano con una K_D de aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos o aproximadamente 1 nM o menos. En algunos casos, la constante de disociación del agente o anticuerpo anti-Notch1 es una constante de disociación determinada usando una proteína de fusión Notch1 que contiene la región proximal del dominio extracelular de Notch1 inmovilizada en un chip Biacore.

50 **[0082]** Los agentes de unión a Notch1 (p. ej., anticuerpos) de la presente descripción se pueden usar en ensayos para la unión específica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero sin limitaciones, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos empleando técnicas como el análisis con Biacore, análisis por FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis por inmunotransferencia, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo tipo «sándwich», ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitina de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación de complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente e inmunoensayo con proteína A.

Estos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Ausubel y col., Eds., 1994; Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley e Hijos, Inc., Nueva York).

[0083] En algunos casos, la unión específica de un agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) a un Notch1 humano puede determinarse usando un ensayo de tipo ELISA. En algunos casos, un ensayo de tipo ELISA comprende preparar el antígeno Notch1, recubrir los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos con el antígeno, añadir a los pocillos el agente de unión a Notch1 o el anticuerpo conjugado con un compuesto detectable como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), incubar durante un periodo de tiempo y detectar la presencia del agente de unión o anticuerpo. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 o anticuerpo no está conjugado con un compuesto detectable, sino que en su lugar se añade al pocillo un anticuerpo secundario conjugado que reconoce el agente de unión a Notch1 o anticuerpo. En algunos casos, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno Notch1, se puede recubrir el pocillo con el agente de unión a Notch1 o anticuerpo, se añade el antígeno al pocillo recubierto y luego se añade un anticuerpo secundario conjugado con un compuesto detectable. Un experto en la materia conocerá los parámetros que pueden modificarse y/u optimizarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de los ELISA que se pueden usar (véase, p. ej., Ausubel y col., Eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, John Wiley e Hijos, Inc., Nueva York en 11.2.1).

[0084] La afinidad de unión de un anticuerpo u otro agente de unión a Notch1 y la velocidad de asociación-disociación de una interacción antígeno-anticuerpo pueden determinarse mediante ensayos de unión competitiva. En algunos casos, un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un antígeno marcado (p. ej., antígeno marcado con ^3H o ^{125}I), o un fragmento o variante del mismo, con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado seguido por la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo por el antígeno y las velocidades de asociación-disociación pueden determinarse a partir de los datos del análisis de las gráficas de Scatchard. En algunos casos se usa el análisis cinético de Biacore para determinar las afinidades de unión y las velocidades de asociación-disociación de los anticuerpos o agentes que se unen a Notch (p. ej., Notch1 humano, Notch2 humano, Notch3 humano, Notch4 humano o Notch de ratón). El análisis cinético de Biacore comprende analizar la unión y disociación de los anticuerpos y sus antígenos (p. ej., proteínas Notch1) que se han inmovilizado en la superficie de un chip Biacore. En algunos casos, los análisis cinéticos de Biacore se pueden usar para estudiar la unión de diferentes anticuerpos en ensayos cualitativos de unión competitiva a epitope.

[0085] En determinados casos, la descripción proporciona un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humana, en el que el anticuerpo comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de los CDR del anticuerpo 52M51 (véase la tabla 1). En algunos casos, el anticuerpo comprende uno o más de las CDR de 52M51, dos o más de las CDR de 52M51, tres o más de las CDR de 52M51, cuatro o más de las CDR de 52M51, cinco o más de las CDR de 52M51, o las seis CDR de 52M51. En algunos casos, el anticuerpo comprende CDR con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones de aminoácidos por CDR. En determinados casos, el o los CDR de la cadena pesada están contenidos en la región variable de la cadena pesada. En determinados casos, el o los CDR de la cadena ligera están contenidos en la región variable de la cadena ligera.

Tabla 1

	52M51
CDR1 de CP	RGYWIE (SEC ID N.º 15)
CDR2 de CP	QILPGTGRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16)
CDR3 de CP	FDGNYGYAMDY (SEC ID N.º 17)
CDR1 de CL	RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18)
CDR2 de CL	GTNNRAP (SEC ID N.º 19)

CDR3 de CL	ALWYSNHWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20)
------------	-------------------------------------

[0086] En determinados casos, el agente de unión es un anticuerpo que comprende (a) una CDR1 de cadena pesada que contiene RGYWIE (SEC ID N.º 15), una CDR2 de cadena pesada que contiene QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16) y/o una CDR3 de cadena pesada que contiene FDGNYGYAMDY (SEC ID N.º 17) y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que contiene RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18), una CDR2 de cadena ligera que contiene GTNNRAP (SEC ID N.º 19) y/o una CDR3 de cadena ligera que contiene ALWYSNHWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20). En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que contiene RGYWIE (SEC ID N.º 15) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena pesada que contiene QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y/o (c) una CDR3 de cadena pesada que contiene FDGNYGYAMDY (SEC ID N.º 17) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En otros casos, el anticuerpo comprende (o además comprende) una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una CDR1 de cadena ligera que contiene RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; (b) una CDR2 de cadena ligera que contiene GTNNRAP (SEC ID N.º 19) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos y/o (c) una CDR3 de cadena ligera que contiene ALWYSNHWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20) o una variante de la misma que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[0087] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 14 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 8. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 14 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 8. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 14 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 8. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 14 y/o una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 8. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 14 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 8. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo.

[0088] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 28. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 28. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 28. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 28. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 28. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo.

[0089] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 90% de

- identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 32. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de
- 5 cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 32. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 32. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada
- 10 que contiene la SEC ID N.º 24 y/o una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 32. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 32. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo.
- 15 **[0090]** En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo, 52M51, producido por la línea celular de hibridoma depositado en la ATCC, en las condiciones del Tratado de Budapest, el 7 de agosto de 2008 y con el número asignado PTA-9405. En algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada de 52M51. En algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada de 52M51, «52M51H4L3», tal y como codifica el ADN depositado en la ATCC según las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008 y con el número asignado PTA-9549. En
- 20 algunos casos, el anticuerpo es una versión humanizada de 52M51, «52M51H4L4». En algunos casos, la descripción proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítoto al cual se une el anticuerpo 52M51. En otros casos, la descripción proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en los casos y/o aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos/casos descritos en cualquier otra parte de este documento, por la unión específica a una región proximal de membrana de no unión al ligando del dominio extracelular
- 25 de Notch1 humano.
- [0091]** La descripción proporciona una variedad de polipéptidos que incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En determinados casos, el polipéptido está aislado. En determinados casos alternativos, el polipéptido está sustancialmente puro.
- 30
- [0092]** En determinados casos, los polipéptidos de la presente descripción pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que comprenden la secuencia de SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 28 o SEC ID N.º 32 (con o sin las secuencias señal/líder). En algunos casos, los polipéptidos comprenden la cadena pesada y/o la cadena ligera proporcionada en la SEC ID N.º 10 y/o SEC ID N.º 4,
- 35 respectivamente (con o sin las secuencias señal/líder). En determinados casos, el polipéptido es un anticuerpo. En determinados casos, el polipéptido se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En determinados casos, el polipéptido comprende una secuencia variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N.º 8 y una secuencia variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N.º 14. En determinados casos, el polipéptido comprende una secuencia variable de cadena ligera que comprende
- 40 la SEC ID N.º 28 y una secuencia variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N.º 24. En determinados casos, el polipéptido comprende una secuencia variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N.º 32 y una secuencia variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N.º 24. En determinados casos, el polipéptido es un anticuerpo. En determinados casos, el polipéptido se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano.
- 45
- [0093]** Los polipéptidos de la presente descripción incluyen los polipéptidos de SEC ID N.º 14, así como los polipéptidos que tienen al menos el 90% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 14 y al menos el 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 14 y, aún en otros casos, el polipéptido que tiene al menos el 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 14. Los polipéptidos
- 50 de la presente descripción incluyen los polipéptidos de SEC ID N.º 8, así como los polipéptidos que tienen al menos el 90% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 8 y al menos el 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 8 y, aún en otros casos, el polipéptido que tiene al menos el 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 8.
- 55 **[0094]** Los polipéptidos de la presente descripción incluyen los polipéptidos de SEC ID N.º 24, así como los polipéptidos que tienen al menos el 90% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 24 y al menos el 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 24 y, aún en otros casos, el polipéptido que tiene al menos el 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 24. Los polipéptidos de la presente descripción incluyen los polipéptidos de SEC ID N.º 28, así como los polipéptidos que tienen al menos

el 90% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 28 y al menos el 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 28 y, aún en otros casos, el polipéptido que tiene al menos el 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 28. Los polipéptidos de la presente descripción incluyen los polipéptidos de SEC ID N.º 32, así como los polipéptidos que tienen al menos el 90% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 32 y al menos el 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 32 y, aún en otros casos, el polipéptido que tiene al menos el 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polipéptidos de SEC ID N.º 32.

[0095] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) se une a Notch1 y modula su actividad. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un antagonista y modula la actividad de Notch1.

[0096] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) es un antagonista de Notch1 e inhibe la actividad de Notch1. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 inhibe al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90% o aproximadamente el 100% de la actividad de la unión de Notch1 humano. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 inhibe la actividad de un Notch1 activado constitutivamente. En algunos casos, el Notch1 activado constitutivamente se expresa en un cáncer hematológico. En determinados casos, el Notch1 activado constitutivamente se expresa en una leucemia linfoblástica aguda de células T.

[0097] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) inhibe la señalización de Notch. Se entiende que un agente de unión a Notch1 que inhibe la señalización de Notch puede, en determinados casos, inhibir la señalización mediada por uno o más Notch, pero no inhibir necesariamente la señalización mediada por todos los Notch. En determinados casos alternativos, se puede inhibir la señalización mediada por todos los Notch humanos. En determinados casos, se inhibe la señalización mediada por uno o más Notch seleccionados a partir del grupo formado por Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. En determinados casos, la inhibición de la señalización de Notch por un agente de unión a Notch1 es una reducción en el nivel de señalización de Notch1 de al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95%.

[0098] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) inhibe la activación de Notch. Se entiende que un agente de unión a Notch1 que inhibe la activación de Notch puede, en determinados casos, inhibir la activación de uno o más Notch, pero no inhibir necesariamente la activación de todos los Notch. En determinados casos alternativos, se puede inhibir la activación de todos los Notch humanos. En determinados casos, se inhibe la activación de uno o más Notch seleccionados a partir del grupo formado por Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. En determinados casos, la inhibición de la activación de Notch por un agente de unión a Notch1 es una reducción en el nivel de activación de Notch1 de al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95%.

[0099] Se conocen en la técnica ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar si un agente de unión a Notch1 (o un posible agente de unión a Notch1) inhibe la activación de Notch. En algunos casos se puede usar un ensayo del indicador luciferasa basado en células que utiliza un vector TCF/indicador Luc que contiene múltiples copias del dominio de unión a TCF antes del extremo 5' de un gen indicador luciferasa de luciérnaga para medir los niveles de señalización de Notch *in vitro*. En otros casos se puede usar un ensayo del indicador luciferasa basado en células que utiliza un vector CBF/indicador Luc que contiene múltiples copias del dominio de unión a CBF antes del extremo 5' de un gen indicador luciferasa de luciérnaga. El nivel de activación de Notch inducido por un ligando de Notch en presencia de un agente de unión a Notch1 se compara con el nivel de activación de Notch inducido por un ligando de Notch en ausencia de un agente de unión a Notch1. En el ejemplo 3 y en las figuras 1B y 1C se proporcionan, sin limitaciones, los ejemplos específicos del uso de dichos ensayos del indicador luciferasa para evaluar la inhibición de la activación de Notch.

[0100] En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 (p. ej., anticuerpos) tienen uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células cancerosas, inhibir el crecimiento de células cancerosas, prevenir o reducir la metástasis de células cancerosas, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor o cáncer, desencadenar la muerte celular de células cancerosas (p. ej., mediante apoptosis), reducir la oncogenicidad de las células cancerosas mediante la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en la población de células cancerosas, diferenciar las células oncógenas a un estado no oncógeno o aumentar la supervivencia de un paciente.

[0101] En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 (p. ej., anticuerpos) son capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas. En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 son capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas *in vitro* (p. ej., poniendo en contacto las células cancerosas con un anticuerpo *in vitro*). En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 son capaces de inhibir el crecimiento del cáncer *in vivo* (p. ej., en un modelo de xenoinjerto en ratón y/o en un humano que tiene cáncer).

[0102] En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 (p. ej., anticuerpos) son capaces de reducir la oncogenicidad de un cáncer hematológico. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 o el anticuerpo es capaz de reducir la oncogenicidad de un cáncer hematológico que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, como un modelo de xenoinjerto en ratón. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 o el anticuerpo es capaz de reducir la oncogenicidad de un cáncer hematológico que comprende células iniciadoras de leucemia en un modelo animal, como un modelo de xenoinjerto en ratón. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es capaz de reducir la oncogenicidad de un cáncer hematológico mediante la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer. En determinados casos, el número o frecuencia de células madre cancerosas en un cáncer se reduce al menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces. En determinados casos, la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas se determina mediante un ensayo de dilución límite usando un modelo animal. Se pueden encontrar ejemplos y guía respecto al uso de ensayos de dilución límite para determinar una reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, por ejemplo, en la publicación internacional N.º WO 2008/042236 y las publicaciones de patentes de EE. UU. N.º 2008/0064049 y 2008/0178305.

[0103] En determinados casos, los agentes de unión de Notch1 o anticuerpos median en la muerte celular de una célula que expresa Notch1 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC implica la lisis celular por células efectoras que reconocen la porción Fc de un anticuerpo. Muchos linfocitos, monocitos, macrófagos tisulares, granulocitos y eosinófilos, por ejemplo, tienen receptores Fc y pueden mediar en la citolisis (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol., 12:1497).

[0104] En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 o anticuerpos desencadenan la muerte de células de células que expresan un receptor Notch1 mediante la activación de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). La CDC implica la unión del complemento sérico a la porción Fc de un anticuerpo y la posterior activación de la cascada de proteínas del complemento, lo que causa daños en la membrana celular y, finalmente, la muerte celular. Se sabe que la actividad biológica de los anticuerpos viene determinada, hasta cierto grado, por los dominios constantes o la región Fc de la molécula de anticuerpo (Uananue y Benacerraf, 1984, Textbook of Immunology, 2ª edición, Williams & Wilkins, p. 218). Los anticuerpos de diferentes clases y subclases difieren a este respecto, como lo hacen los anticuerpos de la misma subclase pero de diferente especie. De los anticuerpos humanos, la IgM es la clase más eficiente de anticuerpos a la hora de unirse al complemento, seguida por IgG1, IgG3 e IgG2, mientras que IgG4 parece bastante deficiente en la activación de la cascada del complemento (Dillman, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Jefferis y col., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). Según la presente descripción, se pueden preparar anticuerpos de aquellas clases que tengan la actividad biológica deseada.

[0105] Se puede usar en ensayos la capacidad de cualquier agente de unión a Notch1 o anticuerpo en particular para mediar la lisis de la célula diana mediante CDC y/o ADCC. En algunos casos, las células de interés se crecen y marcan *in vitro* (células diana) y el anticuerpo se añade al cultivo celular en combinación con complemento sérico o células inmunes que puedan ser activadas por los complejos antígeno-anticuerpo. La citolisis de las células diana se detecta, por ejemplo, mediante la liberación del marcaje de las células lisadas. En algunos casos, los anticuerpos se pueden seleccionar usando el propio suero de un paciente como fuente de complemento y/o células inmunes. El anticuerpo que es capaz de activar el complemento o mediar la ADCC en la prueba *in vitro* se puede después usar terapéuticamente en ese paciente en concreto.

[0106] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) tiene una semivida en circulación en un sujeto o mamífero (p. ej., ratones, ratas, macacos o humanos) de al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana o al menos aproximadamente 2 semanas. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo IgG (p. ej., IgG1 o IgG2) que tiene una semivida en circulación en un sujeto o mamífero (p. ej., ratones, ratas, macacos o humanos) de al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana o al menos aproximadamente 2 semanas. Se conocen en la técnica procedimientos para prolongar la semivida de agentes como polipéptidos y anticuerpos. En algunos casos, los procedimientos conocidos para prolongar la semivida en

circulación de anticuerpos IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc que incrementen la unión dependiente de pH del anticuerpo al receptor Fc neonatal (FcRn) a pH 6,0 (véase, p. ej., las publicaciones de patentes de EE. UU. N.º 2005/0276799, 2007/0148164 y 2007/0122403). Entre los procedimientos conocidos para prolongar la semivida en circulación de fragmentos de anticuerpos que carecen de la región Fc se incluyen, pero sin limitaciones, técnicas como la PEGilación.

[0107] En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 son anticuerpos policlonales. Se pueden preparar anticuerpos policlonales mediante cualquier procedimiento conocido. En algunos casos, los anticuerpos policlonales se obtienen mediante la inmunización de un animal (p. ej., un conejo, rata, ratón, cabra, burro) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente (p. ej., un fragmento peptídico purificado, una proteína recombinante de longitud completa o una proteína de fusión). El antígeno puede conjugarse opcionalmente con un vehículo como hemocianina de lapa californiana (KLH) o albúmina sérica. El antígeno (con o sin una proteína vehículo) se diluye en solución salina estéril y normalmente se combina con un adyuvante (p. ej., adyuvante completo o incompleto de Freund) para formar una emulsión estable. Tras un periodo suficiente de tiempo, los anticuerpos policlonales se recuperan de la sangre, líquido ascítico y similares del animal inmunizado. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar a partir de suero o ascitis según procedimientos estándar en la técnica que incluyen, pero sin limitaciones, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel y diálisis.

[0108] En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridomas conocidos por los expertos en la materia (véase, p. ej., Köhler y Milstein, 1975, Nature 256:495-497). En algunos casos, utilizando el procedimiento de hibridomas, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza como se describe anteriormente para desencadenar a partir de los linfocitos la producción de anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno inmunizante. En algunos casos, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. En algunos casos, el antígeno inmunizante puede ser una proteína humana o una parte de la misma. En algunos casos, el antígeno inmunizante puede ser una proteína de ratón o una parte de la misma.

[0109] Tras la inmunización, los linfocitos se aíslan y fusionan usando una línea celular de mieloma adecuada empleando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que se pueden seleccionar de entre los linfocitos y células de mieloma no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido pueden identificarse mediante diversos procedimientos que incluyen, pero sin limitaciones, inmunoprecipitación, inmunotransferencia y ensayos de unión *in vitro* (p. ej., citometría de flujo, ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima [ELISA] y radioinmunoensayo [RIA]). Los hibridomas se pueden propagar en cultivo *in vitro* usando procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar a partir de medio de cultivo o líquido ascítico según procedimientos estándar en la técnica que incluyen, pero sin limitaciones, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel y diálisis.

[0110] En determinados casos, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante como las conocidas por los expertos en la materia (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 4.816.567). Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan a partir de células B maduras o células de hibridoma, por ejemplo, mediante RT-PCR usando cebadores oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y su secuencia se determina usando técnicas convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados que producen los anticuerpos monoclonales cuando se transfectan en células huésped como *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra forma no producen la proteína inmunoglobulina. En otros casos, los anticuerpos monoclonales recombinantes, o fragmentos de los mismos, se pueden aislar a partir de bibliotecas de despliegue en fagos que expresen las CDR de la especie deseada (véase, p. ej., McCafferty y col., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson y col., 1991, Nature, 352:624-628 y Marks y col., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0111] Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal pueden además modificarse usando la tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunos casos, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden sustituir 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) por un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otros casos, las regiones constantes están truncadas o se han eliminado para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Se puede emplear mutagénesis dirigida a sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad y/u otras características biológicas de un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, se puede emplear mutagénesis dirigida a

sitio de las CDR para optimizar la especificidad, afinidad y/u otras características biológicas de un anticuerpo monoclonal.

[0112] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo humanizado. Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los restos de las CDR están sustituidos por restos de una CDR de una especie no humana (p. ej., ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. En algunos casos, los restos de la región armazón de Fv de una inmunoglobulina humana están sustituidos por los restos correspondientes de un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, el anticuerpo humanizado puede estar además modificado por la sustitución de restos adicionales de la región armazón de Fv y/o dentro de los restos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR que corresponden a las de la inmunoglobulina no humana, o todas o sustancialmente todas las regiones armazón son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. En algunos casos, el anticuerpo humanizado puede también comprender al menos una porción de una región o dominio constante de la inmunoglobulina (Fc), que típicamente es el de una inmunoglobulina humana. En ciertos casos, dichos anticuerpos humanizados se usan terapéuticamente porque pueden reducir la antigenicidad y las respuestas HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se administran a un sujeto humano. Un experto en la materia será capaz de obtener un anticuerpo humanizado funcional con inmunogenicidad reducida siguiendo técnicas conocidas (véase, p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762).

[0113] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En algunos casos, se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, p. ej., Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer y col., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 y las patentes de EE. UU. N.º 5.750.373, 5.567.610 y 5.229.275). En algunos casos, el anticuerpo humano se puede seleccionar a partir de una biblioteca de fagos, en la que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y col., 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Alternativamente, la tecnología de despliegue en fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de los repertorios de genes del dominio variable (V) de las inmunoglobulinas de donantes no inmunizados. También se describen técnicas para la generación y uso de bibliotecas de despliegue en fagos en las patentes de EE. UU. N.º 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404, 6.544.731, 6.555.313, 6.582.915, 6.593.081, 6.300.064, 6.653.068, 6.706.484 y 7.264.963, y Rothe y col., 2008, *J. Mol. Biol.*, 376:1182-1200. Se conocen en la técnica estrategias de maduración de afinidad, como intercambio de cadenas (Marks y col., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783) que se pueden emplear para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

[0114] En algunos casos, los anticuerpos humanos se pueden obtener en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces, tras la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Esta estrategia se describe en las patentes de EE. UU. N.º 5.545.807, 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016.

[0115] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son capaces de reconocer específicamente y unirse a al menos dos epítopes diferentes. Los diferentes epítopes pueden estar dentro de la misma molécula o de moléculas diferentes. En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. En algunos casos, los anticuerpos pueden reconocer y unirse específicamente a un primer antígeno diana (p. ej., Notch1), así como a un segundo antígeno diana, como una molécula efectora o un leucocito (p. ej., CD2, CD3, CD28 o B7) o un receptor de Fc (p. ej., CD64, CD32 o CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el primer antígeno diana. En algunos casos, los anticuerpos se pueden usar para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno diana en particular, como Notch1. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que une un agente citotóxico o un quelante radionucléido, como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. En determinados casos, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a Notch1, así como a al menos un receptor Notch adicional seleccionado a partir del grupo compuesto por Notch2, Notch3 y Notch4 o un ligando de Notch seleccionado a partir del grupo compuesto por Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 y DLL4.

[0116] Los expertos en la materia conocen técnicas para producir anticuerpos biespecíficos, véase por ejemplo,

Millstein y col., 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan y col., 1985, *Science*, 229:81; Suresh y col., 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Traunecker y col., 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659; Shalaby y col., 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny y col., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553; Gruber y col., 1994, *J. Immunol.*, 152:5368 y la patente de EE. UU. N.º 5.731.168). Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo.

5 También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos (Tutt y col., 1991, *J. Immunol.*, 147:60). De este modo, en determinados casos, los anticuerpos anti-Notch1 son multiespecíficos.

10 **[0117]** En determinados casos, el agente de unión a Notch1 o anticuerpo descrito en este documento puede ser monoespecífico. Por ejemplo, en determinados casos, cada uno de los uno o más sitios de unión a antígeno que contiene un anticuerpo es capaz de unirse (o se une) a un epítipo homólogo en Notch1. En determinados casos, un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoespecífico descrito en este documento es capaz de unirse (o se une) a Notch1 y a un segundo Notch, como Notch2, Notch3 o Notch4 (es decir, el mismo epítipo se encuentra en Notch1 y, por ejemplo, en Notch2).

15 **[0118]** En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden tener funciones o capacidades diferentes a las de los anticuerpos intactos; por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden tener mayor penetración en el tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo que incluyen, pero sin limitaciones, la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento F(ab')₂ producido por la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado mediante la reducción de puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂. En otros casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor. En determinados casos, los fragmentos de anticuerpo se producen de forma recombinante. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fv o Fv de cadena sencilla (scFv). Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar y secretar en *E. coli* u otra célula huésped, permitiendo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo se aíslan a partir de bibliotecas de despliegue en fagos como se discute en este documento. Por ejemplo, pueden utilizarse procedimientos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse y col., 1989, *Science* 246:1275-1281) para permitir una identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para una proteína Notch1 o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de anticuerpo lineales como se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.641.870. En determinados casos, los fragmentos de anticuerpo son monoespecíficos o biespecíficos. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es un scFv. Se pueden usar varias técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos de Notch1 (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 4.946.778).

40 **[0119]** Puede ser deseable además, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpos, modificar un anticuerpo con el fin de aumentar su semivida en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un receptor natural que se una al epítipo dentro del fragmento de anticuerpo mediante la mutación de la región correspondiente en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo dentro de una etiqueta peptídica que, a continuación, se fusiona con el fragmento de anticuerpo, ya sea en un extremo o en el centro (p. ej., mediante la síntesis de ADN o péptido).

45 **[0120]** Para los fines de la presente descripción, debe apreciarse que los anticuerpos modificados, o los fragmentos de los mismos, pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con una región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1. A este respecto, la región variable puede proceder de cualquier tipo de mamífero al que se le pueda inducir a desencadenar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas frente a un antígeno deseado (p. ej., Notch1). Así pues, la región variable de los anticuerpos modificados pueden ser, por ejemplo, de humano, murinos, de primate no humano (p. ej., monos macacos, etc.) o de origen salvaje. En algunos casos, tanto las regiones variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otros casos, las regiones variables de anticuerpos compatibles (normalmente derivados de un origen no humano) pueden modificarse genéticamente o adaptarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente descripción se pueden humanizar o alterar de alguna otra forma mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

55 **[0121]** En algunos casos, los dominios variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras se alteran mediante la sustitución al menos parcial de una o más CDR y, si es necesario, mediante la sustitución parcial de la región armazón y la modificación de la secuencia. Aunque las CDR pueden proceder de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del cual proceden las regiones armazón, se prevé que las CDR procedan de un anticuerpo

de diferente clase y, preferiblemente, de un anticuerpo de una especie diferente. Puede ser necesario sustituir todas las CDR con todas las CDR de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Preferiblemente, puede ser necesario transferir solo aquellos restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno.

5

[0122] A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la materia apreciarán que los anticuerpos modificados de esta descripción pueden comprender anticuerpos (es decir, anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha deleciónado o alterado de alguna otra forma, de modo que proporcione las características bioquímicas deseadas, como la mayor localización de células cancerosas, mayor penetración en el tumor, semivida reducida en suero o mayor semivida en suero, cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o sin alterar. En algunos casos, la región constante de los anticuerpos modificados comprende una región constante humana. Las modificaciones en la región constante incluyen adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Los anticuerpos modificados descritos en este documento pueden comprender alteraciones o modificaciones de uno o más de los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o del dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunos casos, uno o más dominios se delecionan parcial o completamente de las regiones constantes de los anticuerpos modificados. En otros casos, el dominio CH2 completo se ha eliminado (construcciones Δ CH2). En algunos casos, el dominio de la región constante omitido se sustituye por un espaciador de aminoácidos corto (p. ej., 10 restos de aminoácidos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular impartida normalmente por la región constante ausente.

[0123] En algunos casos, los anticuerpos modificados están genéticamente modificados para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra del anticuerpo. En otros casos, se inserta un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, pueden expresarse construcciones en las que el dominio CH2 se haya deleciónado y el dominio CH3 que queda (modificado o sin modificar) se une a la región bisagra con un espaciador de 5 a 20 aminoácidos. Dicho espaciador puede añadirse para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante permanecen libres y accesibles o que la región bisagra sigue siendo flexible. No obstante, debe apreciarse que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, mostrar inmunogenicidad y desencadenar una respuesta inmune no deseada contra la construcción. En consecuencia, en determinados casos, cualquier espaciador añadido a la construcción será relativamente no inmunogénico de modo que mantenga las cualidades biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

[0124] En algunos casos, los anticuerpos modificados pueden tener solo una deleción parcial de un dominio constante o una sustitución de unos pocos o incluso un único aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y aumentar de este modo la localización de células tumorales y/o la penetración en el tumor. De forma similar, puede ser deseable simplemente delecionar la parte de uno o más dominios de la región constante que controla una función efectora específica (p. ej., de unión al complemento C1q) que se va a modular. Estas deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras que conservan otras funciones deseadas asociadas con el dominio intacto de la región constante del sujeto. Además, como se ha señalado antes, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser modificados a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencian el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (p. ej., unión a Fc) mientras que se mantienen sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. En determinados casos, los anticuerpos modificados comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características deseadas como el aumento o disminución de la función efectora o proporcionar más unión de citotoxinas o de hidratos de carbono.

[0125] Se conoce en la técnica que la región constante media en varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a la región Fc de anticuerpos IgG o IgM (unidos a antígeno) activa el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y además puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Asimismo, la región Fc de un anticuerpo puede unirse a una célula que exprese un receptor de Fc (FcR). Existen varios receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc de las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas diversas e importantes que incluyen la captación y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpo, el aclaramiento de complejos inmunes, la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células citotóxicas (ADCC), liberación de

mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

[0126] En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 o anticuerpos proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan al perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, en algunos casos, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado en circulación (p. ej., anticuerpo anti-Notch1) aumentando de este modo la localización de células cancerosas y/o penetración en el tumor. En otros casos, las modificaciones de la región constante aumentan o reducen la semivida en suero del anticuerpo. En algunos casos, la región constante se modifica para eliminar los enlaces disulfuro o restos oligosacáridos, lo que permite mejorar la localización de las células cancerosas.

[0127] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 o anticuerpo no tiene una o más funciones efectoras. En algunos casos, el anticuerpo no tiene actividad ADCC y/o actividad CDC. En determinados casos, el anticuerpo no se une al receptor de Fc y/o a factores de complemento. En determinados casos, el anticuerpo no tiene función efectora.

[0128] La presente descripción además abarca variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogas a los anticuerpos quiméricos, humanizados y/o humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, establecidos en este documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadoras, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares.

[0129] Así, la presente descripción proporciona procedimientos para generar un anticuerpo que se une a Notch1. En algunos casos, el procedimiento para generar un anticuerpo que se une a Notch1 comprende el uso de técnicas de hibridomas. En algunos casos, el procedimiento comprende el uso de un dominio extracelular de Notch1 humano o de ratón como antígeno de inmunización. En algunos casos, el procedimiento para generar un anticuerpo que se une a Notch1 comprende el cribado de una biblioteca en fagos humana. La presente descripción además proporciona procedimientos de identificación de un anticuerpo que se une a Notch1. En algunos casos, el anticuerpo se identifica seleccionando la unión a Notch1 con citometría de flujo (FACS). En algunos casos, el anticuerpo se identifica seleccionando la inhibición o bloqueo de la activación de Notch1. En algunos casos, el anticuerpo se identifica analizando la inhibición o bloqueo de la señalización de Notch1.

[0130] En determinados casos, los anticuerpos como se describen en este documento están aislados. En determinados casos, los anticuerpos como se describen en este documento están sustancialmente puros.

[0131] En algunos casos de la presente descripción, los agentes de unión a Notch1 son polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que se unen a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, los polipéptidos comprenden un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. Los expertos en la materia reconocerán que algunas secuencias de aminoácidos de un polipéptido pueden variarse sin efecto significativo para la estructura o función de la proteína. De este modo, los polipéptidos de unión a Notch1 además incluyen variaciones de los polipéptidos que muestran una importante actividad de unión a una región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, las variaciones en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de unión a Notch1 incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y/o sustituciones de tipo.

[0132] Los polipéptidos y sus variaciones pueden modificarse además para contener restos químicos adicionales que no son parte normalmente del polipéptido. Los restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica y/o la absorción del polipéptido. Los restos además pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario no deseado de los polipéptidos y sus variantes. Se puede encontrar una descripción general de los restos químicos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, University of the Sciences Philadelphia 2005.

[0133] Los polipéptidos descritos en este documento pueden producirse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Dichos procedimientos oscilan desde procedimientos de síntesis de proteínas directos hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica una secuencia polipeptídica y que expresa estas secuencias en un huésped adecuado. En algunos casos, se construye una secuencia de ADN usando tecnología recombinante mediante el aislamiento o síntesis de una secuencia de ADN que codifica una proteína natural de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutarse mediante mutagénesis dirigida a sitio para obtener análogos funcionales de la misma (véase, p. ej., Zoeller y col., 1984, PNAS, 81:5662-5066 y la patente de EE. UU. N.º 4.588.585).

[0134] En algunos casos, se puede construir una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés mediante síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos pueden diseñarse en función de la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando los codones favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse procedimientos convencionales para sintetizar una secuencia polinucleotídica que codifique un polipéptido de interés. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen traducido de forma inversa. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido aislado en particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse, y después ligarse, varios oligonucleótidos pequeños que codifiquen porciones del polipéptido deseado. Los oligonucleótidos individuales típicamente contienen salientes 5' ó 3' para el ensamblaje complementario.

[0135] Una vez ensamblados (mediante síntesis, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio u otro procedimiento), las secuencias polinucleotídicas que codifican un polipéptido de interés en particular se pueden insertar en un vector de expresión y se unirán de forma operativa a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión del polipéptido en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado puede confirmarse mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, para obtener niveles elevados de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe unirse de forma operativa a secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional que sean funcionales en los huéspedes de expresión elegidos.

[0136] En determinados casos, los vectores de expresión recombinantes se utilizan para amplificar y expresar ADN que codifica agentes de unión a Notch1 como polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes pueden ser construcciones de ADN replicables que tengan fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifiquen una cadena polipeptídica de un agente de unión a Notch1, anticuerpo o fragmento del mismo, unido de forma operativa a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados derivados de genes mamíferos, microbianos, víricos o de insecto. Una unidad transcripcional generalmente comprende el ensamblaje de (1) un elemento o elementos génicos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o codificadora que se transcribe a ARNm y se traduce a proteína y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción y traducción. Los elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Adicionalmente, puede incorporarse la capacidad para replicarse en un huésped, que normalmente viene conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN están «unidas de forma operativa» cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN de un péptido señal (secuencia líder de la secreción) está unido de forma operativa al ADN de un polipéptido si este se expresa como precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido de forma operativa a una secuencia codificadora si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia codificadora si se coloca de modo que permita la traducción. En algunos casos, los elementos estructurales destinados a su uso en sistemas de expresión en levaduras incluyen preferiblemente una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. En otros casos, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un resto de metionina N-terminal. De forma opcional, este resto puede escindir-se posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

[0137] La elección de la secuencia de control de expresión y del vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de huéspedes/vectores de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, como pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, y plásmidos de gama más amplia, tales como M13 y otros fagos filamentosos de ADN de cadena sencilla.

[0138] Las células huésped adecuadas para la expresión de un agente de unión a Notch1 o anticuerpo (o un polipéptido de Notch1 para su uso como antígeno) incluyen células procariotas, de levadura, de insecto o eucariotas superiores bajo el control de promotores adecuados. Entre los procariotas se incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus*. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero, como se describe más adelante. También se pueden emplear sistemas de traducción sin células.

[0139] Se usan diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar los polipéptidos recombinantes. Puede ser preferible la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero ya que,

generalmente, dichas proteínas se pliegan correctamente, se modifican adecuadamente y son completamente funcionales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas se incluyen las líneas celulares COS-7 (derivadas de riñón de mono), L-929 (derivada de fibroblastos murinos), C127 (derivada de tumor mamario murino), 3T3 (derivada de fibroblasto murino), CHO (derivada de ovario de hámster chino), HeLa (derivada de cáncer de cuello uterino humano) y BHK (derivada de fibroblastos de riñón de hámster). Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen que se desea expresar y otras secuencias no transcritas que flaquean los extremos 5' o 3' y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como los sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donador y aceptor de ajuste y las secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto son bien conocidas por los expertos en la materia (véase, p. ej., Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

[0140] Las proteínas producidas por un hospedador transformado pueden purificarse según cualquier procedimiento adecuado. Dichos procedimientos convencionales incluyen cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para purificación de proteínas. Pueden unirse a la proteína etiquetas de afinidad, como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de la cubierta del virus de la gripe y la glutatión-S-transferasa, que permiten una fácil purificación pasándola a través de una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente usando técnicas como proteólisis, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

[0141] En algunos casos, los sobrenadantes de los sistemas de expresión que secretan proteínas recombinantes al medio de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación adecuada. En otros casos, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa y otros tipos empleados frecuentemente en la purificación de proteínas. En algunos casos, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Entre los intercambiadores catiónicos adecuados se incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. En algunos casos, se puede emplear un medio de hidroxiapatita (CHT), que incluye pero sin limitaciones, hidroxiapatita cerámica. En algunos casos, pueden emplearse para una purificación adicional de una proteína recombinante una o más etapas de HPLC en fase inversa, empleando medios de HPLC-RP hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tenga grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

[0142] En algunos casos, la proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, mediante la extracción inicial a partir de sedimentos de células, seguido de una o más etapas de concentración, precipitación con sales, cromatografía de intercambio iónico acuoso o de exclusión molecular. Puede emplearse HPLC para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden lisarse por cualquier procedimiento conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica o el uso de agentes de lisis celular.

[0143] Entre los procedimientos conocidos en la técnica para la purificación de anticuerpos y otras proteínas también se incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

[0144] En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es un polipéptido que no es un anticuerpo. Se conocen en la técnica diversos procedimientos para identificar y producir polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con alta afinidad a una proteína diana. Véase, por ejemplo, Skerra, 2007, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304; Hosse y col., 2006, *Protein Science*, 15:14-27; Gill y col., 2006, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658; Nygren, 2008, *FEBS J.*, 275:2668-76 y Skerra, 2008, *FEBS J.*, 275:2677-83. En determinados casos, la tecnología de despliegue en fagos puede utilizarse para producir y/o identificar un polipéptido de unión a Notch1. En determinados casos, el polipéptido de unión a Notch1 comprende una estructura proteica de un tipo seleccionado a partir del grupo compuesto por proteína A, proteína G, una lipocalina, un dominio fibronectina, un dominio de repeticiones consenso de anquirina y tioredoxina.

[0145] En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 o anticuerpos se pueden usar en cualquiera de las formas conjugadas (es decir, un inmunoconjugado o radioconjugado) o no conjugadas. En determinados casos, los anticuerpos se pueden usar en forma no conjugada para estimular los mecanismos de defensa natural del sujeto,

como la citotoxicidad dependiente de complemento y la toxicidad celular dependiente de anticuerpo, para eliminar las células malignas o cancerosas.

[0146] En algunos casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo o polipéptido) se conjuga con un agente citotóxico. En algunos casos, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico que incluye, pero sin limitaciones, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes. En algunos casos, el agente citotóxico es una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, que incluye, pero sin limitaciones, la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina, cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. En algunos casos, el agente citotóxico es un radioisótopo para producir un radioconjugado o un anticuerpo radioconjugado. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados que incluyen, pero sin limitaciones ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re y ²¹²Bi. También se pueden usar conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula de bajo peso molecular, como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad como toxina. Se obtienen conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de conjugación de proteínas como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobezoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor biactivos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

[0147] Los anticuerpos heteroconjugados también se incluyen dentro del alcance de la presente descripción. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células inmunes frente a células no deseadas (patente de EE. UU. N.º 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento.

[0148] En determinados casos, la descripción abarca polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido que se une específicamente a Notch1 o un fragmento de dicho polipéptido. La expresión «polinucleótido que codifica un polipéptido» abarca un polinucleótido que incluye solo secuencias codificadoras para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias codificadoras y/o no codificadoras adicionales. Por ejemplo, la descripción proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo frente a un Notch1 humano o que codifica un fragmento de dicho anticuerpo. Los polinucleótidos de la descripción pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético y puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, y si es de cadena sencilla, puede ser la hebra codificadora o la hebra no codificadora (complementaria).

[0149] En determinados casos, se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 28 y SEC ID N.º 32. En algunos casos, se proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido (con o sin la secuencia señal) que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 26 y SEC ID N.º 30.

[0150] En algunos casos, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica (con o sin la secuencia señal) seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 25 y SEC ID N.º 29.

[0151] En determinados casos, se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido (con o sin la secuencia señal) que tiene una secuencia nucleotídica al menos el 80% idéntica, al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica y, en algunos casos, al menos el 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada a partir de grupo compuesto por las SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 25 y SEC ID N.º 29. En algunos casos, los polinucleótidos tienen una secuencia nucleotídica al menos el 90% idéntica a la SEC ID N.º 7 o SEC ID N.º 13.

[0152] También se proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que hibrida con la SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 25 o SEC ID N.º

29 y/o con un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 31 o SEC ID N.º 32. En determinados casos, la hibridación se hace en condiciones muy rigurosas.

5

[0153] En determinados casos, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificadora del polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura que un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido a partir de una célula huésped (p. ej., una secuencia líder que funciona como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula). El polipéptido con una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para producir la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más restos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez escindida la prosequencia, queda la proteína madura activa.

10

[0154] En determinados casos, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificadora del polipéptido maduro fusionada en el mismo marco de lectura que una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación y/o identificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para facilitar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe cuando se usa un huésped mamífero (p. ej., células COS-7). En algunos casos, la secuencia marcadora es una etiqueta FLAG, un péptido de secuencia DYKDDDK (SEC ID N.º 33) que puede usarse junto con otras etiquetas de afinidad.

20

[0155] La presente descripción además se refiere a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en este documento que codifican, por ejemplo, fragmentos, análogos y/o derivados.

25

[0156] En determinados casos, la presente descripción proporciona polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia nucleotídica al menos el 80% idéntica, al menos el 85% idéntica, al menos el 90% idéntica, al menos el 95% idéntica y, en algunos casos, al menos el 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, frente a Notch1 humano descrito en este documento.

30

[0157] Según se usa en este documento, la frase un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos, por ejemplo, el 95% «idéntica» a una secuencia nucleotídica de referencia pretende significar que la secuencia nucleotídica del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco puntos de mutación por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos el 95% idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia, se pueden delecionar o sustituir hasta el 5% de los nucleótidos de la secuencia de referencia con otro nucleótido, o se pueden insertar en la secuencia de referencia varios nucleótidos hasta el 5% de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en posiciones de los extremos 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

40

[0158] Las variantes polinucleotídicas pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, en las regiones no codificadoras o en ambas. En algunos casos, las variantes polinucleotídicas contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o delecciones silenciosas que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos casos, las variantes polinucleotídicas contienen sustituciones «silenciosas» debido a la degeneración del código genético. Las variantes polinucleotídicas pueden producirse por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones en un huésped en particular (p. ej., cambiar codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano como *E. coli*).

50

[0159] En algunos casos, los polinucleótidos pueden comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si se presenta, la modificación de la estructura nucleotídica puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede además modificarse tras la polimerización, por ejemplo mediante conjugación con un componente marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, «grupos protectores»; sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo; modificaciones internucleotídicas, tales como enlaces no cargados (p. ej., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos y carbamatos) y con enlaces cargados (p. ej.,

55

- fosforotioatos y fosforoditioatos); restos colgantes, tales como proteínas (p. ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal y poli L-lisina); intercaladores (p. ej., acridina y psoraleno); quelantes (p. ej., metales, metales radiactivos, boro y metales oxidantes); agentes alquilantes; enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos); así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes de forma habitual en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores convencionales o activados para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. Los grupos OH de los extremos 5' y 3' terminales pueden estar fosforilados o sustituidos con aminas o restos de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos pueden derivatizarse también a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas, y lioxosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, heptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos no básicos, como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitaciones, casos en los que el fosfato se sustituye por P(O)S («tioato»), P(S)S («ditioato»), (O)NR₂ («amidato»), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ («formacetal»), en el que cada R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen que ser idénticos.
- 20 **[0160]** En determinados casos, los polinucleótidos como se describen en este documento están aislados. En determinados casos, los polinucleótidos como se describen en este documento están sustancialmente puros.

- [0161]** También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en este documento. En algunos casos, un vector de expresión comprende una molécula de polinucleótido. En algunos casos, una célula huésped comprende un vector de expresión que comprende la molécula de polinucleótido. En algunos casos, una célula huésped comprende una molécula de polinucleótido.

III. Procedimientos de uso y composiciones farmacéuticas

- 30 **[0162]** Los agentes de unión a Notch1 (p. ej., polipéptidos y/o anticuerpos) de la descripción son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero sin limitaciones, procedimientos de tratamiento terapéutico, como el tratamiento de un cáncer hematológico. En determinados casos, los agentes son útiles para la modulación de la actividad Notch1, la inhibición de la actividad Notch1, la inhibición o bloqueo de las interacciones Notch1/ligando de Notch, la inhibición de la señalización de Notch1 y/o la inhibición de la activación de Notch1. En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 son útiles para bloquear la escisión de Notch1, para la inhibición de la escisión con la región proximal a la membrana, para la inhibición de la escisión en el sitio S2 dentro de la región proximal a la membrana y para la inhibición de la liberación del dominio intracelular de Notch1. En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 son útiles en la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la reducción del volumen de células cancerosas, la reducción de la población de células cancerosas, la reducción de la oncogenicidad de un cáncer hematológico, la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en un cáncer hematológico, la reducción de la frecuencia de células iniciadoras de leucemia en un cáncer hematológico, la inducción de la muerte de las células cancerosas y/o la inducción de diferenciación. Los procedimientos de uso pueden ser procedimientos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 (p. ej., un polipéptido y/o anticuerpo) es un antagonista de Notch1. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 es un antagonista de la vía de señalización de Notch. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un antagonista de la activación de Notch1.

- [0163]** En determinados casos, los agentes de unión a Notch1 como se describen en este documento se usan en el tratamiento de una enfermedad asociada a la señalización y activación de Notch. En casos particulares, la enfermedad es una enfermedad asociada a una vía de señalización de Notch. En casos particulares, la enfermedad es una enfermedad asociada a un Notch1 activado constitutivamente. En algunos casos, el crecimiento de las células cancerosas se asocia con una vía de señalización de Notch. En algunos casos, el crecimiento de las células cancerosas se asocia con la activación de Notch1. En algunos casos, la enfermedad es un cáncer hematológico. En determinados casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, la enfermedad es leucemia linfoblástica aguda de células T.

- [0164]** La presente descripción además proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento de un cáncer hematológico usando los agentes de unión a Notch1 descritos en este documento. En determinados casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico comprende poner en contacto las células

tumorales con un agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) *in vitro*. Por ejemplo, se cultiva una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que exprese Notch1 en la superficie celular en un medio al cual se añade el anticuerpo u otro agente que inhibe el crecimiento de las células cancerosas. En algunos casos, las células cancerosas se aíslan a partir de la muestra de un paciente, como por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre, y se cultivan en medio al cual se le añade un agente de unión a Notch1 para inhibir el crecimiento de dichas células cancerosas.

[0165] En algunos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico comprende poner en contacto las células cancerosas con un agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) *in vivo*. En determinados casos, el contacto de las células cancerosas con un agente de unión a Notch1 se lleva a cabo en un modelo animal. Por ejemplo, en un modelo animal de leucemia, se irradian subletalmente ratones inmunocomprometidos (p. ej., ratones NOD/SCID) y, posteriormente, en el plazo de 24 horas se les inyecta por vía intravenosa células de leucemia humana primaria. Se ha demostrado que las células de leucemia humana pueden injertarse en los tejidos hematopoyéticos de los ratones. En un modelo alternativo, a los ratones inmunocomprometidos (p. ej., ratones NOD/SCID) se les inyecta por vía intravenosa células de leucemia humana primaria sin irradiación previa. En un modelo animal diferente para leucemia, se irradian subletalmente ratones inmunocomprometidos (p. ej., ratones NOD/SCID) y, posteriormente, se «precondicionan» con células mononucleares de médula ósea o de sangre de cordón umbilical humanas. Tras un periodo de tiempo (p. ej., 5-7 días), a estos ratones se les inyectan células procedentes de un paciente que sufre un cáncer hematológico como una leucemia linfoblástica aguda de células T. Se ha demostrado que las células de leucemia se injertan en estos ratones precondicionados (véase, p. ej., Dialynas y col., 2001, Stem Cells 19:443-452, Dialynas y col., 2001, Blood 97:3218-3225 y las patentes de EE. UU. N.º 6.930.222 y 7.186.880).

[0166] En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 (p. ej., anticuerpos) se administran inmediatamente después de la inyección de las células de cáncer hematológico para estudiar el efecto de dichos agentes de unión a Notch1 tras el injerto de las células cancerosas. En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 se administran antes de la inyección de las células de cáncer hematológico (p. ej., células de leucemia). En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 administrados después de las células de cáncer hematológico se han injertado en los ratones para estudiar el efecto de los agentes de unión a Notch1 después de un cáncer hematológico establecido. En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 administrados después de las células de cáncer hematológico se han injertado en ratones precondicionados para estudiar el efecto de los agentes de unión a Notch1 después de un cáncer hematológico establecido. En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 se administran a los ratones 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, etc. antes de inyectar las células de cáncer hematológico (p. ej., células de leucemia) a los ratones. En algunos casos, los agentes de unión a Notch1 se administran a los ratones 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, etc. después del injerto de las células de cáncer hematológico. Después de la administración de agentes de unión a Notch1, se observa en los ratones la inhibición del injerto de las células cancerosas y/o la inhibición del crecimiento de las células cancerosas. En algunos casos, las células madre cancerosas se aíslan a partir de la muestra de un paciente, como por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre, y se inyectan a ratones inmunocomprometidos a los que se administra a continuación un agente de unión a Notch1 para inhibir el crecimiento de las células cancerosas. En algunos casos, las células madre cancerosas se aíslan a partir de la muestra de un paciente, como por ejemplo, una biopsia de tejido, derrame pleural o muestra de sangre, y se inyectan a ratones inmunocomprometidos precondicionados irradiados a los que se administra a continuación un agente de unión a Notch1 para inhibir el crecimiento de las células cancerosas. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se administra al mismo tiempo o inmediatamente después de la introducción de las células cancerosas en el animal para prevenir el crecimiento de las células cancerosas. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se administra como agente terapéutico después de que las células cancerosas se hayan injertado y se haya establecido un cáncer hematológico. En algunos casos, las células del cáncer hematológico comprenden células madre cancerosas. En algunos casos, las células del cáncer hematológico comprenden células iniciadoras de leucemia.

[0167] La descripción proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento de un cáncer hematológico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el cáncer hematológico comprende células madre cancerosas. En algunos casos, el cáncer hematológico comprende células iniciadoras de leucemia. En algunos casos, el procedimiento comprende dirigirse a las células madre cancerosas o a las células iniciadoras de leucemia con los anticuerpos anti-Notch1 descritos en este documento. En determinados casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos anti-Notch1 descritos en este documento.

- 5 **[0168]** En determinados casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico comprende la reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer, la reducción del número de células madre cancerosas en el cáncer, la reducción de la oncogenicidad del cáncer y/o la reducción de la oncogenicidad del cáncer mediante la reducción del número o frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer. En algunos casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico comprende la inhibición de la actividad de un receptor Notch1. En determinados casos, el cáncer hematológico incluye, pero sin limitaciones, leucemia mielógena aguda, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple o leucemia linfoblástica aguda de células T. En algunos casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T.
- 10 **[0169]** En determinados casos, el procedimiento de tratamiento de un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado con un resto citotóxico que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1 humano e inhibe el crecimiento del cáncer. En determinados casos, el procedimiento de tratamiento de un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de cualquiera de los aspectos y/o casos, así como otros aspectos y/o casos descritos en este documento, en combinación con radioterapia. En determinados casos, el procedimiento de tratamiento de un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de cualquiera de los aspectos y/o casos, así como otros aspectos y/o casos descritos en este documento, en combinación con quimioterapia.
- 15 **[0170]** En otro aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar un cáncer hematológico en un sujeto que lo necesita que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de una proteína receptora Notch1 humana y que inhibe el crecimiento del cáncer en el sujeto. En determinados casos, el procedimiento para tratar un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal. En determinados casos, el procedimiento para tratar un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo quimérico. En determinados casos, el procedimiento para tratar un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado. En determinados casos, el procedimiento para tratar un cáncer hematológico comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humano.
- 20 **[0171]** En determinados casos, el procedimiento de inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Notch1. En determinados casos, el sujeto es un humano. En determinados casos, el sujeto tiene un cáncer hematológico. En determinados casos, al sujeto se le han extraído las células cancerosas. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es el anticuerpo 52M51. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es una versión humanizada de 52M51.
- 25 **[0172]** En determinados casos, la célula de cáncer hematológico expresa Notch1 al cual se une el agente de unión a Notch1 o el anticuerpo. En algunos casos, el tumor sobreexpresa un Notch1 humano. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1 e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1, interfiere con las interacciones Notch1/ligando de Notch e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1, inhibe la activación de Notch e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1 y reduce la frecuencia de las células madre cancerosas en el cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a un Notch1 activado constitutivamente e inhibe la actividad de Notch1.
- 30 **[0173]** En determinados casos, el cáncer hematológico es una leucemia mielógena aguda, un linfoma de Hodgkin, un mieloma múltiple o una leucemia linfoblástica aguda de células T. En determinados casos, el cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda. En algunos casos, el cáncer hematológico es linfoma de Hodgkin. En determinados casos, el cáncer hematológico es mieloma múltiple. En determinados casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T. En determinados casos, el sujeto es un humano.
- 35

[0174] La presente descripción además proporciona procedimientos para tratar un cáncer hematológico usando los agentes de unión a Notch1 descritos en este documento. En determinados casos, el cáncer hematológico se caracteriza por células que expresan Notch1 al cual se une el agente de unión a Notch1 (p. ej., anticuerpo). En determinados casos, el cáncer hematológico sobreexpresa Notch1 humano. En determinados casos, el cáncer hematológico se caracteriza por células que expresan Notch1, en el que el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) interfiere con la señalización y/o activación de Notch inducida por el ligando de Notch. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1 e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1, interfiere con las interacciones Notch1/ligando de Notch e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se une a Notch1, inhibe la activación de Notch1 e inhibe o reduce el crecimiento del cáncer hematológico. En algunos casos, el agente de unión a Notch se une a Notch y reduce la frecuencia de las células madre cancerosas en el cáncer hematológico.

[0175] La presente descripción proporciona procedimientos para tratar un cáncer hematológico que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Notch1 a un sujeto (p. ej., un sujeto que necesita el tratamiento). En determinados casos, el sujeto es un humano. En determinados casos, el sujeto tiene un cáncer hematológico. En determinados casos, al sujeto se le han extraído las células cancerosas. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es el anticuerpo 52M51. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es una versión humanizada de 52M51.

[0176] En determinados casos, el cáncer hematológico es un cáncer seleccionado a partir del grupo compuesto por leucemia mielógena aguda, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple y leucemia linfoblástica aguda de células T. En determinados casos, el cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda. En algunos casos, el cáncer hematológico es linfoma de Hodgkin. En determinados casos, el cáncer hematológico es mieloma múltiple. En determinados casos, el cáncer hematológico es leucemia linfoblástica aguda de células T. En determinados casos, el sujeto es un humano.

[0177] La descripción también proporciona un procedimiento de inhibición de la señalización de Notch o de la activación de Notch en una célula que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente de unión a Notch1. En determinados casos, la célula es una célula de cáncer hematológico. En determinados casos, el procedimiento es un procedimiento *in vivo* en el que la etapa de poner en contacto la célula cancerosa con el agente de unión a Notch1 que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión a Notch1 al sujeto. En algunos casos, el procedimiento es un procedimiento *in vitro* o *ex vivo*. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 inhibe la señalización de Notch. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 inhibe la activación de Notch. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 interfiere con la interacción Notch1/ligando de Notch. En determinados casos, el agente de unión a Notch1 inhibe la activación de Notch de al menos un receptor Notch adicional seleccionado a partir del grupo compuesto por Notch2, Notch3 y Notch4. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es un anticuerpo. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es el anticuerpo 52M51. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es una versión humanizada de 52M51.

[0178] Además, la descripción proporciona un procedimiento de reducción de la oncogenicidad de un cáncer hematológico en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión a Notch1 al sujeto. En determinados casos, el cáncer hematológico comprende células madre cancerosas. En determinados casos, el cáncer hematológico comprende células iniciadoras de leucemia. En determinados casos, la frecuencia de células madre cancerosas en el cáncer hematológico se reduce mediante la administración del agente de unión a Notch1. La descripción también proporciona un procedimiento de reducción de la frecuencia de células madre cancerosas en un cáncer hematológico que comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un agente de unión a Notch1. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es el anticuerpo 52M51. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 es una versión humanizada de 52M51.

[0179] La descripción también proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, en el que la enfermedad o trastorno se caracteriza por un nivel mayor de células madre cancerosas, células iniciadoras de leucemia y/o células progenitoras. En algunos casos, los procedimientos de tratamiento comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión a Notch1, polipéptido o anticuerpo al sujeto.

[0180] La presente descripción además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de unión a Notch1, anticuerpos o polipéptidos como se describe en este documento. Estas composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la inhibición del crecimiento de un cáncer hematológico y el tratamiento de un cáncer hematológico en pacientes humanos.

[0181] Las formulaciones se preparan para su almacenamiento y uso combinando un antagonista purificado (p. ej., anticuerpo) de la presente descripción con un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., transportador, excipiente, etc.) (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, University of the Sciences Philadelphia, 2005).

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitaciones, tampones no tóxicos, como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes como cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10
10 restos de aminoácidos); proteínas como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; hidratos de carbono como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos como complejos Zn-proteína y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

15

[0182] La composición farmacéutica de la presente descripción se puede administrar en variedad de formas para el tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (como en las membranas mucosas que incluyen la administración vaginal y rectal) tales como parches transdérmicos, podamas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar tales como inhalación o insuflación de polvos o aerosoles (que
20 incluyen nebulizadores), intratecal, intranasal, epidérmica y transdérmica; oral; parenteral que incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, intratumoral, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal como intratecal o intraventricular.

[0183] La formulación terapéutica puede estar en forma farmacéutica de monodosis. Dichas formulaciones incluyen
25 comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medio no acuoso, o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración mediante inhalación. En composiciones sólidas como comprimidos, el principio activo principal está mezclado con un vehículo farmacéutico. Los componentes convencionales para comprimidos incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes (p. ej., agua) para formar una composición
30 preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente descripción o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición preformulación sólida se divide a continuación en formas farmacéuticas de monodosis del tipo descrito en este documento. Los comprimidos, pastillas, etc. de la composición nueva pueden recubrirse o combinarse de alguna otra forma para proporcionar una forma farmacéutica que ofrece la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o pastilla puede comprender una
35 composición interna recubierta por un componente externo. Asimismo, los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve como resistencia a la desintegración y permite que el componente interno pase intacto por el estómago o que se retrase su liberación. Se pueden usar diversos materiales para estas capas o revestimientos entéricos, entre estos materiales se incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como goma laca shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

40

[0184] Las formulaciones farmacéuticas incluyen anticuerpos de la presente descripción formando complejos con liposomas (Epstein, y col., 1985, PNAS, 82:3688; Hwang, y col., 1980, PNAS, 77:4030 y las patentes de EE. UU. 4.485.045 y 4.544.545). Se describen liposomas con mayor tiempo de circulación en la patente de EE. UU. N.º
45 5.013.556. Algunos liposomas se pueden generar mediante evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de un tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado.

[0185] Los anticuerpos también se pueden atrapar en microcápsulas. Dichas microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de
50 hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmecacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos 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, 21ª edición, University of the Sciences Philadelphia 2005.

[0186] Además, se pueden hacer preparados de liberación mantenida. Entre los ejemplos adecuados de preparados de liberación mantenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados (p. ej., en películas o microcápsulas). Entre los ejemplos de matrices de liberación mantenida se incluyen poliésteres, hidrogeles como poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol), polilactidas (patente de EE. UU. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-

glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glucólico degradables como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glucólico y acetato de leuprolide), acetato isobutirato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. En algunos casos, los anticuerpos se pueden usar para tratar diversas afecciones caracterizadas por la expresión y/o mayor sensibilidad de las células a un marcador de células madre cancerosas. En particular, se prevé que los anticuerpos contra un marcador de célula madre cancerosa, por ejemplo Notch1, se usarán para tratar trastornos proliferativos que incluyen, pero sin limitaciones, tumores benignos y malignos del riñón, hígado, vejiga, mama, estómago, ovario, colon, recto, próstata, pulmón, vulva, tiroides, cabeza y cuello, cerebro (p. ej., glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma) y cánceres hematológicos como leucemias y linfomas.

10

[0187] En determinados casos, además de la administración de un agente de unión a Notch1, el procedimiento o tratamiento además comprende la administración de al menos un agente terapéutico adicional. Se puede administrar un agente terapéutico adicional antes de, concomitantemente con, y/o después de la administración de un agente de unión a Notch1. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a Notch1 y el o los agentes terapéuticos. En algunos casos, el al menos un agente terapéutico adicional comprende 1, 2, 3 o más agentes terapéuticos adicionales.

15

[0188] En la terapia de combinación con al menos dos agentes terapéuticos a menudo se usan agentes que funcionan a través de mecanismos de acción diferentes, aunque esto no es necesario. La terapia de combinación usando agentes con diferentes mecanismos de acción pueden dar lugar a efectos aditivos o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que se usa en monoterapia, reduciendo así los efectos tóxicos secundarios. La terapia de combinación puede reducir la probabilidad de que las células cancerosas desarrollen resistencia. La terapia de combinación puede permitir dirigir un agente a las células madre cancerosas oncogénas y un segundo agente a las células cancerosas no oncogénas.

20

[0189] Se apreciará que la combinación de un agente de unión a Notch1 y un agente terapéutico adicional puede administrarse en cualquier orden o concomitantemente. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se administrará a los pacientes que hayan recibido previamente tratamiento con un segundo agente terapéutico. En otros casos determinados, el agente de unión a Notch1 y un segundo agente terapéutico se administrará de forma sustancial simultánea o concomitantemente. Por ejemplo, se puede administrar a un sujeto el agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) mientras se está sometiendo a un ciclo de tratamiento con un segundo agente terapéutico (p. ej., quimioterapia). En determinados casos, el agente de unión a Notch1 se administrará en el plazo de 1 año desde el tratamiento con el segundo agente terapéutico. En determinados casos alternativos, el agente de unión a Notch1 se administrará en el plazo de 10, 8, 6, 4 o 2 meses desde cualquier tratamiento con el segundo agente terapéutico. En otros casos determinados, el agente de unión a Notch1 se administrará en el plazo de 4, 3, 2 o 1 semana desde cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En algunos casos, el agente de unión a Notch1 se administrará en el plazo de 5, 4, 3, 2 o 1 día desde cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. Se apreciará además que los dos (o más) agentes o tratamientos se pueden administrar al sujeto en pocas horas o minutos (es decir, sustancialmente de forma simultánea).

25

[0190] Los agentes terapéuticos usados para el tratamiento de cánceres hematológicos incluyen, pero sin limitaciones, daunorubicina, doxorubicina, mitoxantrona e idarubicina; inhibidores de la topoisomerasa como etopósido, tenipósido y topotecán; inhibidores de la síntesis de ADN como carboplatino; agentes que dañan el ADN como ciclofosfamida e ifosfamida; enzimas citotóxicas como asparraginas y pegaspargasa; inhibidores de tirosina quinasas como mesilato de imatinib, dasatinib y nilotinib; antimetabolitos como azacitidina, clofarabina, citarabina, cladribina, fludarabina, hidroxiurea, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina y nelarabina; hormonas sintéticas como prednisona, prednisolona y dexametasona, agentes antimitóticos como vincristina e inhibidores del proteasoma como bortezomib.

30

[0191] Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con los agentes de unión a Notch1 incluyen los agentes terapéuticos nombrados anteriormente, así como otros agentes quimioterapéuticos. De este modo, en algunos casos, el procedimiento o el tratamiento supone la administración combinada de un agente de unión a Notch1 o anticuerpo y un agente quimioterapéutico o mezcla de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un agente de unión a Notch1 o anticuerpo puede realizarse antes de, concomitantemente con, o después de la administración de quimioterapias. La administración combinada puede incluir la coadministración, bien en una formulación farmacéutica única o bien usando formulaciones separadas, o la administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un periodo de tiempo de modo que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. El preparado y las pautas posológicas para estos agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones del fabricante o como determine empíricamente el médico

35

40

45

50

55

experto. El preparado y las pautas posológicas para esta quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

[0192] Entre los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente descripción se incluyen, pero sin limitaciones, 5 agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluye altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiófosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; 10 nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, 15 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, arabinósido de citosina, dideoxiuridina, doxiluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antiadrenales such as aminoglutetimida, 20 mitotano, trilostano; restablecedores de ácido fólico como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamino; demecolcino; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxano; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; 25 dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (Ara-C); taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido; ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina; ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y las sales, ácidos o 30 derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Entre los agentes quimioterapéuticos también se incluyen agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas, como antiestrógenos, sobre los tumores como por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston) y antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolído y goserelina, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables 35 de cualquier de los anteriores.

[0193] En determinados casos, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de la topoisomerasa. Los inhibidores de la topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos que interfieren con la acción de una enzima topoisomerasa (p. ej., topoisomerasa I o II). Entre los inhibidores de la topoisomerasa se incluyen, pero sin limitaciones, doxorubicina HCl, 40 citrato de daunorubicina, mitoxantrona HCl, actinomicina D, etopósido, toptecán HCl, tenipósido e irinotecán, así como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos.

[0194] En determinados casos, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito. Un antimetabolito es un compuesto químico con una estructura que es similar a un metabolito necesario para reacciones bioquímicas normales, pero 45 suficientemente diferente como para interferir con una o más funciones normales de las células, como la división celular. Entre los antimetabolitos se incluyen, pero sin limitaciones, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato sódico, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, arabinósido de citosina, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina y cladribina, así como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos.

[0195] En determinados casos, el agente quimioterapéutico es un agente antimetabólico, que incluye, pero sin limitaciones, agentes que unen tubulina. En algunos casos, el agente es un taxano. En determinados casos, el agente es paclitaxel o docetaxel, o una sal, ácido o derivado farmacéuticamente aceptable de paclitaxel o docetaxel. En determinados casos alternativos, el agente antimetabólico comprende un alcaloide de la vinca, como vincristina, 50 vinblastina, vinorelbina o vindesina, o sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de estos.

[0196] En algunos casos, el tratamiento supone un agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) como se describe en este documento en combinación con un agente quimioterapéutico seleccionado a partir del grupo compuesto por prednisona, vincristina, daunorubicina, L-asparaginasa, metotrexato y ciclofosfamida. En algunos casos, el agente

terapéutico adicional es imatinib, nelarabina o dastinib. En algunos casos, el agente terapéutico adicional es idarubicina, arabinósido de citosina, metoxantrona o gemtuzumab ozogamicina.

[0197] En determinados casos, el tratamiento supone la administración combinada de un agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) de la presente descripción y radioterapia. El tratamiento con un agente de unión a Notch1 puede realizarse antes de, concomitantemente con, o después de la administración de radioterapia. Las pautas posológicas para dicha radioterapia pueden ser determinadas por el médico experto. En algunos casos, el agente de unión o anticuerpo se administra después de la radioterapia. En algunos casos, el agente de unión o anticuerpo se administra con la radioterapia.

10

[0198] En algunos casos, un segundo agente terapéutico comprende un anticuerpo. De este modo, el tratamiento puede suponer la administración combinada de un agente de unión a Notch1 (p. ej., un anticuerpo) de la presente descripción con otros anticuerpos adicionales frente a antígenos asociados a tumor que incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2, DLL4, Notch o NF- κ B. A modo de ejemplo, se describen por ejemplo anticuerpos anti-DLL4 en la patente de EE. UU. N.º 7.750.124. Se describen anticuerpos anti-DLL4 adicionales, por ejemplo, en las publicaciones de patentes internacionales N.º WO 2008/091222 y WO 2008/0793326, y las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. N.º 2008/0014196, 2008/0175847, 2008/0181899 y 2008/0107648. A modo de ejemplo, se describen por ejemplo anticuerpos anti-Notch en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2008/0131434. La administración combinada puede incluir la coadministración, bien en una formulación farmacéutica única o bien usando formulaciones separadas, o la administración consecutiva en cualquier orden pero generalmente dentro de un periodo de tiempo de modo que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.

[0199] Además, el tratamiento con los agentes de unión a Notch1 descritos en este documento pueden incluir el tratamiento de combinación con uno o más citoquinas (p. ej., linfoquinas, interleuquinas, factores de necrosis tumoral y/o factores de crecimiento) o puede ir acompañado de la extirpación quirúrgica de tumores, células cancerosas o cualquier otra terapia que se estime necesaria por el médico responsable del tratamiento. Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo u otro agente de la presente descripción depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines terapéuticos o preventivos, el tratamiento previo, los antecedentes clínicos del paciente, etc., todo a discreción del médico responsable del tratamiento. El anticuerpo o agente se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días a varios meses, o hasta que se logre una cura o se consiga una disminución del estado de la enfermedad (p. ej., reducción del tamaño del tumor). Las pautas posológicas óptimas se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el organismo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un antagonista individual. El médico que realiza la administración puede determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de administración y las frecuencias de repetición. En general, la dosis es de 0,01 μ g a 100 mg por kg de peso corporal y se puede administrar una o más veces al día, a la semana, al mes o al año. El médico responsable del tratamiento puede estimar las frecuencias de repetición de la administración en función de los tiempos de permanencia medidos y de las concentraciones del anticuerpo o agente en los líquidos o tejidos del organismo.

[0200] La presente descripción proporciona kits que comprenden los anticuerpos descritos en este documento y que se pueden usar para realizar los procedimientos descritos en este documento. En algunos casos, un kit comprende al menos un anticuerpo purificado frente a Notch1 humano, en uno o más recipientes. En algunos casos, un kit comprende al menos uno anticuerpo purificado frente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano, en uno o más recipientes. En algunos casos, un kit comprende el anticuerpo 52M51 o una variante humanizada de 52M51.

EJEMPLOS

50

Ejemplo 1

[0201] Se generaron anticuerpos frente a una región de no unión al ligando de Notch1, específicamente la región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular. En determinadas realizaciones, se generaron fragmentos polipeptídicos recombinantes del dominio extracelular de Notch1 humano como antígenos para la producción de anticuerpos. Se utilizó la tecnología convencional de ADN recombinante para aislar los polinucleótidos que codificaban la región proximal a la membrana del dominio extracelular de los aminoácidos 1427-1732 de Notch1 humano (SEC ID N.º 1). Estos polinucleótidos se ligaron por separado en el extremo N-terminal en marco a un Fc humano y a una etiqueta de histidina y se clonaron en un vector plasmídico de transferencia para la expresión mediada

por baculovirus en células de insecto. Se utilizaron protocolos convencionales de transfección, infección y cultivo celular para producir células de insecto recombinantes que expresan el correspondiente polipéptido de Notch1 que corresponde a la región proximal a la membrana que comprende los aminoácidos 1427-1732 (SEC ID N.º 2) (O'Reilly y col., 1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press).

5

[0202] El polipéptido de la región proximal a la membrana de Notch1 (aminoácidos 1472-1732 de Notch1) se purificó a partir de lisados de las células de insecto usando cromatografía de afinidad con Ni²⁺-quelato y proteína A como conocen los expertos en la materia. El polipéptido de la región proximal a la membrana de Notch1 purificado se dializó frente a PBS (pH = 7), se concentró hasta aproximadamente 1 mg/ml y se filtró a esterilidad en una preparación para
10 inmunización.

[0203] Se inmunizaron ratones (n = 3) con proteína antigénica Notch1 purificada (Antibody Solutions; Mountain View, CA) usando técnicas convencionales. Aproximadamente 70 días después de la inmunización inicial se analizó en la sangre de cada ratón individual el reconocimiento del antígeno mediante ELISA y FACS (como se describe en este
15 documento). Se seleccionaron los dos animales con los títulos de anticuerpo más altos para el refuerzo de antígeno final tras lo cual se aislaron las células del bazo para la producción de hibridomas. Las células de hibridoma se dispusieron a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos y se analizó en el sobrenadante de cada pocillo mediante ELISA y FACS la actividad frente al polipéptido de la región proximal a la membrana de Notch1. Se seleccionaron varios hibridomas con un título alto de anticuerpo y se llevaron a cultivo en matraz estático. Los anticuerpos se
20 purificaron a partir del sobrenadante de los hibridomas mediante cromatografía en agarosa de proteína A o proteína G. Los anticuerpos monoclonales purificados se analizaron de nuevo mediante FACS como se describe en este documento. Se aislaron varios anticuerpos que reconocían la región proximal a la membrana del dominio extracelular del Notch1 humano. Una línea celular de hibridoma que expresaba el anticuerpo 52M51 se depositó en la ATCC, en las condiciones del Tratado de Budapest, el 7 de agosto de 2008 y se le asignó la Designación de Depósito de Patente
25 ATTC PTA-9405. Se determinaron las secuencias de nucleótidos y proteínas predichas de la cadena pesada (SEC ID N.º 9 y 10) y de la cadena ligera (SEC ID N.º 3 y 4) del anticuerpo 52M51.

Anticuerpos humanos

[0204] En realizaciones alternativas, los anticuerpos humanos que reconocen específicamente la región proximal a la membrana de no unión al antígeno del dominio extracelular de un receptor Notch1 se aíslan usando la tecnología de despliegue en fagos. En determinadas realizaciones, en una biblioteca de anticuerpos sintéticos que contiene los dominios variables de anticuerpos humanos se analiza el reconocimiento específico y de alta afinidad de un antígeno del receptor Notch descrito en este documento. En determinadas realizaciones, se hace un cribado de una biblioteca
35 de despliegue en fagos de Fab humanos usando una serie de proteínas recombinantes que comprenden la región proximal a la membrana de no unión al ligando del dominio extracelular de un receptor Notch1. Brevemente, en la ronda uno se incuban partículas de fago que despliegan 2×10^{13} Fab con proteína recombinante (inmovilizada pasivamente), los fagos no específicos se eliminan mediante lavado y, a continuación, los fagos específicos se eluyen con pH bajo (células) o DTT (proteína recombinante). El resultado del eluido se usa para infectar bacterias TG1 F+,
40 se recupera con un fago auxiliar y, posteriormente, se induce el despliegue de Fab con IPTG (0,25 nM). Este proceso se repite durante dos rondas más y después, en la ronda tres se hace un cribado en ELISA frente al antígeno inmovilizado pasivamente (5 µg/ml).

[0205] Los casetes de CDR de la biblioteca se intercambian específicamente por medio de sitios de restricción
45 flanqueantes únicos para la optimización de anticuerpos. A continuación, se clonan las regiones variables humanas optimizadas en un vector de expresión de Ig que contiene la cadena pesada y la cadena ligera kappa de la IgG1 humana para la expresión de anticuerpos humanos en células CHO.

Mapeo de epítopes

50

[0206] Para identificar anticuerpos que reconocen una región proximal a la membrana de no unión al ligando específica de los dominios extracelulares del receptor Notch1, se realiza un mapeo de epítopes. En determinadas realizaciones, se generan vectores plasmídicos de expresión en mamíferos que comprenden un promotor de CMV antes del extremo 5' de los polinucleótidos que codifican fragmentos del dominio Notch1 extracelular como proteínas
55 de fusión Fc, usando tecnología de ADN recombinante convencional. En determinadas realizaciones, se realiza el mapeo de epítopes de la serie 52M de anticuerpos frente a la región de no unión al ligando usando una serie de proteínas de fusión y deleciones de la región proximal a la membrana del dominio extracelular de un Notch1 humano desde aproximadamente el aminoácido 1427 a aproximadamente el aminoácido 1732. Estas proteínas de fusión recombinantes se expresan en células HEK 293 transfectadas transitoriamente de las cuales se recoge el medio

condicionado 24 a 48 horas después de la transfección para su análisis mediante ELISA.

[0207] En determinadas realizaciones, los fragmentos de proteína de fusión Notch1 se separan en geles de SDS-PAGE y se analizan con ambos anticuerpos anti-Fc para detectar la presencia de todas las proteínas de fusión frente a anticuerpos anti-Notch1 para detectar los dominios reconocidos por cada anticuerpo anti-Notch.

Ejemplo 2

[0208] Se generaron anticuerpos humanizados frente a la región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano. Los dominios variables del anticuerpo monoclonal murino 52M51 se aislaron y secuenciaron a partir de la línea de hibridoma usando PCR degenerada esencialmente como se describe en Larrick, J.M., y col., 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160:1250 y en Jones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, Bio/Technology 9:88. Las regiones armazón variables de las cadenas pesada y ligera humanas probablemente similares en estructura a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 52M51 parental, se consideran entonces como regiones armazón humanas de referencia para ayudar en el diseño de nuevas regiones armazón sintéticas. Para identificar las regiones armazón humanas que portan similitud con las regiones armazón murinas de 52M51, se comparan las secuencias proteicas predichas codificadas por los dominios variables murinos V_H y V_L de 52M51 con las secuencias del anticuerpo humano codificadas por el ADNc humano expresado empleando búsquedas en BLAST de secuencias humanas depositadas en GenBank. Usando este procedimiento, se seleccionaron secuencias de ADNc humanas expresadas (p. ej., GenBank DA975021, DB242412) y dominios V_H de línea germinal (p. ej., IGHV1-24) para su posterior análisis en el diseño de regiones armazón de la cadena pesada. De forma similar, se consideraron las secuencias de ADNc humanas expresadas (p. ej., GenBank CD709370, CD707373) y V_L de línea germinal (p. ej., IGLV7-46, IGLV8-61) en el diseño de las regiones armazón de la cadena ligera.

[0209] Las diferencias en aminoácidos entre las regiones armazón humanizadas candidatas de las cadenas pesadas y los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino 52M51 parental se evaluaron para determinar su probable importancia y hacer un juicio sobre si cada diferencia en la posición contribuye al adecuado plegamiento y función del dominio variable. Este análisis se basó en el examen de estructuras cristalinas resueltas de otros fragmentos de anticuerpo (p. ej., la estructura de Fab 2E8 como se describe en Trakhanov y col., 1999, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 55:122-28, así como estructuras cristalinas de otras proteínas [p. ej., estructuras del banco de datos de proteínas 1ADQ y 1GIG]). Las estructuras se modelaron usando software informáticos como Jmol, quick PDB y Pymol. Se tuvo en cuenta el posible impacto de un aminoácido en una posición determinada sobre el empaquetamiento de la región armazón en lámina- β , la interacción entre los dominios variables de las cadenas pesada y ligera, el grado de exposición al solvente de la cadena lateral del aminoácido y la probabilidad de que un aminoácido afectara a la posición de los lazos de CDR. A partir de este análisis, se concibieron y sintetizaron químicamente nueve cadenas V_H candidatas fusionadas en marco con la región constante de la IgG2 humana y ocho cadenas V_L candidatas fusionadas en marco con la región constante IgLC1 humana. Las cadenas pesadas candidatas comprenden: i) una región armazón sintética diseñada para asemejarse a las regiones armazón humanas naturales y ii) los CDR del anticuerpo murino 52M51 parental.

[0210] La funcionalidad de cada cadena pesada y ligera humanizada variante candidata se analizó mediante cotransfección en células de mamífero. Cada una de las nueve cadenas pesadas de 52M51 humanizadas candidatas descritas anteriormente se cotransfectaron en células HEK 293 con el ADNc de la cadena ligera de 52M51 murino y se analizó mediante ELISA la actividad de unión a Notch1 del medio condicionado. Se seleccionó la variante de la cadena pesada de 52M51 que mostró la unión más fuerte. Esta variante «52M51-H4» (SEC ID N.º 22) contiene, además de las CDR murinas, variaciones en tres posiciones armazón dentro de la región armazón V_H , las posiciones Kabat 20, 48 y 71, en comparación con una región armazón humana de ejemplo (p. ej., IGHV1-24). La cadena pesada humanizada 52M51-H4 se cotransfectó después en células HEK 293 con cada una de las ocho cadenas ligeras humanizadas candidatas y se analizó de nuevo en el medio condicionado la unión a antígeno mediante un ELISA. Se encontró que dos variantes de la cadena ligera, «52M51 L3» (SEC ID N.º 26) y «52M51 L4» (SEC ID N.º 30), mostraban mejor unión que las demás candidatas, por lo que se eligieron para posteriores estudios. La variante 52M51 L3 contiene, además de los CDR murinos, variación en una posición armazón en la posición Kabat 49 en comparación con una región armazón humana de ejemplo (p. ej., IGLV7-46). Se desarrollaron dos anticuerpos variantes humanizados, 52M51H4L3 y 52M51H4L4. El polinucleótido que codifica 52M51H4L3 se depositó en la ATCC en las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008 y se le asignó el número de designación PTA-9549.

[0211] Las afinidades para Notch1 humano y de ratón se determinaron usando un instrumento Biacore 2000. Brevemente, las proteínas Notch1 humana y de ratón recombinantes se inmovilizaron en un chip CM5 usando química basada en aminas convencional (NHS/EDC). Se inyectaron diferentes concentraciones de anticuerpo sobre las

superficies de proteína y se recopilaron los datos cinéticos a lo largo del tiempo. Los datos se ajustaron usando la ecuación de ajuste global simultáneo para obtener las constantes de disociación (K_D , nM) para cada Notch1 (tabla 2).

Tabla 2

5

Constantes de disociación de IgG (K_D)		
Anticuerpo	Notch1 humano (nM)	Notch1 de ratón (nM)
52M51	2,86	No unido
52M51H4L3	4,33	No unido
52M51H4L4	7,35	No unido

Ejemplo 3

Señalización del receptor Notch

10

[0212] Se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-Notch1 para bloquear la señalización de Notch mediada por ligando. Células HeLa modificadas genéticamente para sobreexpresar Notch1 (Notch1-HeLa) cultivadas en DMEM complementado con antibióticos y STF al 10% se cotransfectaron con 1) el vector pGL4 8X CBF luciferasa de luciérnaga que contenía un promotor sensible a Notch antes del extremo 5' de un gen indicador de luciferasa de luciérnaga para medir los niveles de señalización de Notch en respuesta al ligando DLL4 y 2) un indicador luciferasa Renilla (Promega, Madison, WI) como control interno de la eficiencia de la transfección. Las células transfectadas se añadieron a placas de cultivo recubiertas durante toda la noche con 200 ng/pocillo de proteína hDLL4-Fc y después se añadieron los anticuerpos anti-Notch1 al medio de cultivo. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se midieron los niveles de luciferasa usando un kit de ensayo de luciferasa doble (Promega, Madison WI) con actividad luciferasa de luciérnaga normalizada para la actividad luciferasa Renilla. De este modo, se determinó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la activación de la vía Notch1. Los anticuerpos 52M51, 52M63, 52M74 y 52M80, generados contra una región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano (fig. 1A), reducían significativamente la actividad luciferasa, lo que era indicativo de una reducción de la señalización de Notch1 en comparación con otros anticuerpos Notch1 (fig. 1B). Además, una variante humanizada del anticuerpo 52M51, la variante 52M51H4L3 mostraba una potencia similar a la hora de reducir la actividad luciferasa (fig. 1C).

[0213] La escisión de receptores Notch por furina, ADAM y gamma-secretasa da lugar a la formación del dominio intracelular (ICD) de Notch, lo que desencadena la posterior señalización de Notch en el núcleo. La capacidad de los anticuerpos anti-Notch1 para bloquear la activación del receptor mediada por ligando se determinó mediante análisis por inmunotransferencia. Se crecieron las células Notch1-HeLa en un cultivo en suspensión en medio 293-SMII (Invitrogen, Carlsbad CA). Las células cultivadas se transfirieron a placas de 96 pocillos en las que pocillos seleccionados se habían recubierto previamente con proteína de fusión DLL4-Fc humana (2 µg/ml) en DMEM más SBF al 2 % y MG132 1 µM (Calbiochem, San Diego CA). Los anticuerpos generados contra una región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano se añadieron al medio de cultivo celular y las células se incubaron a 37°C durante 5 horas. A continuación se aspiraron los pocillos y las células se resuspendieron en tampón de desarrollo SDS 2X. Las muestras se sonicaron a temperatura ambiente y se sometieron a PAGE en presencia de SDS y a análisis por inmunotransferencia usando un anticuerpo específico del ICD de Notch1 escindido según las recomendaciones del fabricante (Cell Signaling Technology, Danvers MA). El anticuerpo 52M51, así como los anticuerpos 52M63, 52M74 y 52M80 inhibían significativamente la generación del ICD después de la estimulación por ligando (fig. 1D).

Ejemplo 4

Evaluación de los anticuerpos anti-Notch1 en un modelo de xenoinjerto de leucemia

45

[0214] Ratones NOD/SCID de seis a ocho semanas de edad recibieron 350 rads de radiación corporal total en un equipo de rayos X Pantak HF320 con un tubo de rayos X MXR. Inmediatamente después, se inyectaron 1×10^7 células mononucleares de médula ósea humana (Lonza, Walkersville MD) en 0,2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a través de la vena de la cola. Siete días después, se resuspendieron 5×10^6 células de leucemia humana primaria viables en 0,2 ml de PBS y se inyectaron a través de la vena de la cola. Comenzando un día después, los animales fueron tratados con anticuerpo control (LZ1) o anticuerpo que se une a la región proximal a la membrana del dominio extracelular de Notch1 humano (52M51). Los anticuerpos se administraron a una dosis de 15 mg/kg i.p. una

vez a la semana.

[0215] Cinco semanas después de la inyección de las células de leucemia y del tratamiento con anticuerpo, se evaluó el nivel de injerto de las células de leucemia en los ratones mediante citometría de flujo. Se usó 5 inmunofluorescencia de dos colores para identificar las células de leucemia humana. Se analizó la presencia de células humanas en los bazos de los ratones usando un anticuerpo frente al marcador CD45 humano. Las suspensiones celulares de los bazos de ratones se lisaron en Pharmlyse (BD Biosciences, San Jose CA) y, posteriormente, se lavaron y resuspendieron en HBSS más SBF al 2%. En cada caso, las células se tiñeron con un anticuerpo frente a CD34 (BD Biosciences, San Jose CA) además del anticuerpo frente a CD45. Un anticuerpo de ratón generado frente 10 a la lisozima humana (LZ-1) sirvió como anticuerpo control de isotipo. Las células también se tiñeron con DAPI como marcador de la viabilidad celular.

[0216] Después de la tinción, las células se lavaron, se resuspendieron en HBSS más SBF al 2% y se mantuvieron en hielo antes del análisis. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo Canto II (Beckman Coulter, Brea 15 CA). Las células no viables se excluyeron en función de la captación de DAPI, los controles de isotipo correspondientes se procesaron para cada muestra de tejido y se usaron para definir los parámetros de selección, los cuales excluían al menos el 99,9% de las células del isotipo control. Los bazos de los ratones NOD/SCID no injertados se usaron como controles adicionales para verificar los parámetros de selección. El injerto de las células de leucemia humana se definió como la expresión de al menos el 0,1% de células CD45 positivas en una muestra. 20

[0217] Como se muestra en la figura 2, los ratones inyectados con células de leucemia humana y tratados con anticuerpo anti-Notch1 52M51 tenían un nivel significativamente menor de injerto (39,7%, $p < 0,001$) en comparación con ratones tratados con un anticuerpo control (61,8%).

25 Ejemplo 5

Evaluación *in vitro* de la inhibición de Notch1 en células HPB-ALL

[0218] Las células HPB-ALL se adquirieron de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). 30 La línea celular HPB-ALL se estableció a partir de la sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda y timoma, y se clasificó como una leucemia de células T humana. Se añadieron 5000 células HPB-ALL a cada uno de los pocillos de las placas de 96 pocillos en medio de cultivo (RPMI con SBF al 15%) y se trataron con anticuerpo anti-Notch1 52M51 (- ■ -), un anticuerpo control (- ▼ -) o dibenzacepina, un inhibidor de gamma-secretasa (- ● -). Los anticuerpos se usaron a una concentración de 100 µg/ml con diluciones seriadas 1/3 hasta 1,7 ng/ml. La 35 dibenzacepina se usó a una concentración de 12 µM con diluciones seriadas 1/3 hasta 0,2 nM y sirvió como control positivo. Las muestras se analizaron por triplicado y el experimento se repitió al menos 4 veces. Después de 8 días se analizó la viabilidad celular usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison WI). Como se muestra en la figura 3, el anticuerpo anti-Notch1 52M51 era capaz de reducir la viabilidad de las células HBP-ALL, lo que demuestra que la inhibición de Notch1 podría tener efecto sobre 40 la leucemia de células T humana *in vitro*.

Ejemplo 6

Evaluación *in vitro* de la inhibición de Notch1 sobre la proliferación de células HPB-ALL

45 **[0219]** Ki67 es un antígeno nuclear presente en células humanas en proliferación y se puede usar para cuantificar el porcentaje de células en proliferación en un cultivo celular. Las células HBP-ALL se cultivaron en presencia de DBZ 12 µM, 100 µg/ml de 52M51 o 100 µg/ml de anticuerpo control. Después de 5 días se renovó el medio y el día 9 se analizó en las células la presencia de proteína Ki67. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con una 50 solución de formaldehído al 4% con PBS durante 5 minutos. Las células se lavaron en PBS y se permeabilizaron usando tampón PBS con 0,5% de saponina y 2,5% de BSA. La proteína Ki67 se detectó con un anticuerpo anti-Ki67 conjugado con FITC (BD Biosciences, San Jose CA). Como se muestra en la figura 4, el anticuerpo anti-Notch1 52M51 reducía el porcentaje de células HPB-ALL en proliferación aproximadamente un 40% en comparación con las células tratadas con anticuerpo control (60% de células Ki67 positivas en comparación con el 98% de células Ki67 positivas). 55

Ejemplo 7

Evaluación *in vitro* de la inhibición de Notch1 sobre la formación del ICD

[0220] Las células HBP-ALL se cultivaron en presencia de DBZ 12 μ M, 100 μ g/ml de 52M51, 100 μ g/ml de A2G1 o 100 μ g/ml de anticuerpo control. Después de 5 días se renovó el medio y las células se recogieron el día 9. Se prepararon extractos de proteínas de células completas con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Molecular, Pleasanton CA). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron en TBS-T (solución salina tamponada con tris más 0,1% de Tween 20) que contenía un 5% de leche desnatada para bloquear la unión inespecífica. Las membranas se incubaron a continuación con un anticuerpo monoclonal de conejo que detectaba el dominio intracelular (ICD) de Notch1 (clon D3B8, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS-T con 0,5% de leche. Las membranas se incubaron también con anticuerpo de ratón anti-actina (clon AC-15, Sigma, St. Louis MO). El anticuerpo primario unido se detectó con anticuerpos anti-conejo/ratón conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove PA) y se visualizaron con reactivo para inmunotransferencia ECL Plus™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Como se muestra en la figura 5, el anticuerpo anti-Notch 52M51 reducía la cantidad de formación de ICD en las células HBP-ALL tratadas en comparación con las células tratadas con anticuerpo control.

15

Ejemplo 8

Inhibición del crecimiento tumoral de HBP-ALL *in vivo* por el anticuerpo anti-Notch1 52M51

[0221] Las células HBP-ALL (7×10^6 células) se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Se dejaron crecer los tumores hasta un tamaño promedio de tumor de aproximadamente 111 mm³. El día 13 los animales se asignaron aleatoriamente en grupos (n = 10 por grupo) y fueron tratados con un anticuerpo control (anticuerpo anti-lisozima LZ-1, -■-) o el anticuerpo anti-Notch1 52M51 (-▼-). Los anticuerpos se administraron a una dosis de 15 mg/kg dos veces a la semana mediante inyección intraperitoneal. El crecimiento tumoral se midió los días indicados después del tratamiento con calibres electrónicos. Como se muestra en la figura 6, el tratamiento con anticuerpo anti-Notch1 52M51 dio lugar a una reducción significativa del crecimiento de los tumores HBP-ALL en comparación con el anticuerpo control (p < 0,0001).

Ejemplo 9

30

Evaluación de los anticuerpos anti-Notch1 en un modelo de xenoinjerto de leucemia diseminada

[0222] Se usaron células HBP-ALL para establecer xenoinjertos de leucemia diseminada en un modelo de ratón. Las células HBP-ALL (5×10^6 células) se inyectaron en la vena lateral de la cola de ratones NOD/SCID de 6-8 semanas de edad. Un día después de la inyección de las células de leucemia, los animales se asignaron aleatoriamente en grupos (n = 11-13 por grupo) y fueron tratados con un anticuerpo control, el anticuerpo anti-lisozima LZ-1 (-■-) o el anticuerpo anti-Notch1 52M51 (-▼-). Los anticuerpos se administraron en una única dosis a 15 mg/kg. Se controló a los ratones al menos dos veces a la semana en busca de signos de enfermedad, como pérdida de peso del 15 al 20%, postura encorvada y desaliño, hinchazón craneal y parálisis de las extremidades posteriores. El día 38, una parte de los ratones del grupo de tratamiento con el anticuerpo control mostraban una pérdida de peso corporal del 15% y se sacrificaron todos los animales de ambos grupos. Se determinó la presencia de células de leucemia humanas en el bazo, sangre periférica y médula ósea.

[0223] Cinco semanas después de la inyección de las células de leucemia y del tratamiento con anticuerpos, se evaluó el nivel de injerto de las células de leucemia en los ratones mediante citometría de flujo. Se usó inmunofluorescencia de dos colores para identificar las células de leucemia humana. Se recogieron muestras de médula ósea, sangre periférica y los bazos de los ratones y se analizó la presencia de células humanas usando un anticuerpo frente al marcador CD3 humano. Las suspensiones celulares se lisaron en Pharmlyse (BD Biosciences) y, posteriormente, se lavaron y resuspendieron en HBSS más SBF al 2%. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD45 de ratón-FITC y anticuerpo anti-H-2K^d de ratón-FITC (clones 30F11 y SF1-1.1.1, respectivamente, eBioscience, San Diego CA) para el recuento de células murinas, y con anticuerpo anti-CD3 humano-PE (clon OKT3, eBioscience, San Diego CA) para el recuento de células de leucemia humanas. Las células también se tiñeron con DAPI como marcador de la viabilidad celular.

[0224] Después de la tinción, las células se lavaron, se resuspendieron en HBSS más SBF al 2% y se mantuvieron en hielo antes del análisis. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo Canto II (Beckman Coulter, Brea CA). Las células no viables se excluyeron en función de la captación de DAPI, los controles de isotipo correspondientes se procesaron para cada muestra de tejido y se usaron para definir los parámetros de selección, los cuales excluían al menos el 99,9% de las células del isotipo control. Se usaron células de ratones NOD/SCID no injertados y células

HILDYSFGGGAGRDI PPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFND
PWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHC
DQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVVLPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVV
FKRDAHGQQMI FPYYGREEELRKHP I KRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGRRRRE
LDPMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSET
VEPPPP

Secuencias del anticuerpo de ratón 52M51:

- 5 SEC ID N.º 3 Secuencia polinucleotídica de la cadena ligera de 52M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCTCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCCAG
GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAC TAGTA ACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAAA
CCTGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG

ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTCCGGT
GGAGGAACCAA ACTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTT
CCACCTTCCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT
TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGT
ATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTG
ACCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAA
GGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGACTGTTCCCTAG

- 10 SEC ID N.º 4 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 52M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEK
PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG
METTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS

- 15 SEC ID N.º 5

Secuencia polinucleotídica de la región variable de la cadena ligera de 52M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCCAG
GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAAAA
CCTGATCATTATTTACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCT
GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
ACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGT
GGAGGAACCAAACACTGACTGTCCTAGGC

SEC ID N.º 6 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

5

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
PDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVG
GGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG

SEC ID N.º 7 Secuencia polinucleotídica de la región variable de la cadena ligera de 52M51 sin la supuesta secuencia señal

10

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTC
ACTTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACACTAGTAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAA
AAACCTGATCATTATTTACTGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTT
CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA
CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTT

GGTGGAGGAACCAAACACTGACTGTCCTAGGC

SEC ID N.º 8 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51 sin la supuesta secuencia señal

15

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV
PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVGGGTKLTVLG

SEC ID N.º 9 Secuencia polinucleotídica de la cadena pesada de 51M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

20

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
GTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA
GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAAATAAC
TCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
TGGAAGTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGAC
CTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTC
ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGG
GATTGTGGTTGTAAGCCTTGTCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTC
CCCCCAAAGCCCAAGGATGTCCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTG
GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAG
GTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC
AGTGAAGTTCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTC
AACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATATCCAAAACCAAGGCAGACCG
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTC
AGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATAACAGTGGAGTGGCAGTGG
AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCATCATGAACACGAATGGCTCT
TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC
ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACATACTGAGAAGAGCCTCTCCCAC
TCTCCTGGTAAATGA

SEC ID N.º 10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 51M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

5

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
GHGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPR
DCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE
VHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP
KAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGS
YFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

SEC ID N.º 11 Secuencia polinucleotídica de la región variable de la cadena pesada de 52M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

5

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAG
GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC
TGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCT
GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTACAAT
GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAACATG
CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGATGGT
AACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEC ID N.º 12 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

10

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRP
GHGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDG
NYGYYAMDYWGQSSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT

SEC ID N.º 13 Secuencia polinucleotídica de la región variable de la cadena pesada de 52M51 sin la supuesta secuencia señal

15

CAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
TCCTGCAAGGCTGCTGGCTACACAATGAGAGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG
CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAGTGGGAGAACTAACTAC
AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCAAC
ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATTTGAT
GGTAACTACGGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCC
TCA

SEC ID N.º 14 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51 sin la supuesta secuencia señal

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAAGYTMRGYWIEWIKQRPGHGLEWIGQILPGTGRTNY
NEKFKGKATFTADTSSNTANMQLSSLTSEDSAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGSSVTVS
SA

SEC ID N.º 15 CDR1 de la cadena pesada de 52M51

5

RGYWIE

SEC ID N.º 16 CDR2 de la cadena pesada de 52M51

10 QILPGTGRTNYNEKFKG

SEC ID N.º 17 CDR3 de la cadena pesada de 52M51

FDGNYGYYAMDY

15

SEC ID N.º 18 CDR1 de la cadena ligera de 52M51

RSSTGAVTTSNYAN

20 SEC ID N.º 19 CDR2 de la cadena ligera de 52M51

GTNNRAP

SEC ID N.º 20 CDR3 de la cadena ligera de 52M51

25

ALWYSNHWVFGGGTKL

Secuencias de 52M51 humanizado:

30 **[0228]**

SEC ID N.º 21 Secuencia polinucleotídica de la cadena pesada de 52M51-H4 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

ATGGATTGGACATGGAGGGTGTTCCTGCCTCCTCGCTGTGGCTCCTGGAGTCCTGAGCCAG
GTCCAGCTCGTCCAGAGCGGGGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGCGCTAGCGTCAAAATCAGC
TGTAAGGTCAGCGGATACACACTGAGGGGATACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCA
GGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCCAGATCCTGCCTGGAACCGGAAGGACAAATTACAAT
GAGAAGTTTAAGGGAAGGGTCACAATGACAGCAGACACAAGCACAGACACAGCTTATATG
GAACTCAGCTCCCTCAGATCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGTGCCAGGTTTCGATGGA
AATTACGGATACTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGGACAACGGTCACCGTGAGCTCA
GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG
TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT

GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEC ID N.º 22 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 52M51-H4 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

5

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
NYGYAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVR
KCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLVTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N.º 23 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51-H4 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

5

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
NYGYAMDYWGQGT TTVTVSSA

SEC ID N.º 24 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 52M51-H4 sin la supuesta secuencia señal

10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKI SCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY
NEKFKGRVTMTADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGT TTVTVS
SA

SEC ID N.º 25 Secuencia polinucleotídica de la cadena ligera de 51M51-L3 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

15

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
GGAGTGGATAGCCAGGCCGTCGTACACAGGAACCTAGCCTCACCGTTAGCCCTGGAGGA
ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
TGGTTCCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA

GCTCCCGGAGTCCCGCCAGGTTCTCCGGCTCCCTCCTGGGTGGCAAGGCTGCTCTGACA
CTCAGCGGTGCCAGCCAGAGGATGAAGCGGAGTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
TGCCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTCACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC
GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

SEC ID N.º 26 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 51M51-L3 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
 PVKVGVEITTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC

5 SEC ID N.º 27 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L3 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
 WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
 HWVFGGGTKLTVLG

10 SEC ID N.º 28 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L3 sin la supuesta secuencia señal

SGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
 RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

15 SEC ID N.º 29 Secuencia polinucleotídica de la cadena ligera de 52M51-L4 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

ATGAGCGTCCCTACAATGGCTTGGATGATGCTCCTGCTGGGACTCCTGGCTTATGGAAGC
 GGAGTGGATAGCCAGACCGTCGTCACACAGGAACCTAGCTTTTCCGTTAGCCCTGGAGGA
 ACAGTCACACTGACCTGTAGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACAACAAGCAATTACGCTAAC
 TGGTATCAGCAGACTCCCGGTCAAGCCCCTAGAACCCTCATCGGCGGCACCAATAACAGA
 GCTCCCGGAGTCCCGACAGGTTCTCCGGCTCCATCCTGGGAAATAAAGCTGCTCTGACA
 ATCACAGGTGCCCAGGCTGACGATGAAAGCGACTACTACTGTGCACTGTGGTACAGCAAC
 CATTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGTTAACCGTCTCCTCGGGCAGCCTAAGGCTGCTCCT
 AGCGTCACACTGTTCCCCCATCTAGCGAGGAGCTGCAGGCTAACAAGGCAACCCTCGTC
 TGCTGGTTAGCGACTTCTACCCTGGCGCTGTACAGTGGCCTGGAAAGCTGACGGCTCC
 CCTGTGAAAGTTGGCGTCGAAACCACAAAGCCTTCTAAGCAGAGCAATAATAAATATGCC

GCAAGCTCCTACCTCTCCCTGACTCCTGAGCAGTGGAAAAGCCATAGGAGCTACTCCTGC
 CGGGTCACACACGAAGGAAGCACAGTGGAAAAGACAGTCGCCCCCTGCTGAGTGTAGCTGA

20 SEC ID N.º 30 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 51M51-L4 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQT~~PGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES~~DYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKVG~~VETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS~~HRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

SEC ID N.º 31 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 51M51-L4 (la supuesta secuencia señal aparece subrayada)

5

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WYQQT~~PGQAPRTLIGGTNNRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES~~DYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLG

SEC ID N.º 32 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 52M51-L4 sin la supuesta secuencia señal

10

~~SGVDSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWYQQT~~PGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES~~DYYCALWYSN~~HWVFGGGTKLTVLG

SEC ID N.º 33 Etiqueta FLAG

15 DYKDDDK

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal a la membrana de no unión al ligando de un dominio extracelular de Notch1 humano para su uso en el tratamiento de un cáncer hematológico, en el que el
5 cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple o leucemia linfoblástica aguda de células T; y en el que el anticuerpo comprende:
- una CDR1 de cadena pesada que contiene RGYWIE (SEC ID N.º 15);
- 10 una CDR2 de cadena pesada que contiene QILPGTGRTNYNEKFKG (SEC ID N.º 16);
- una CDR3 de cadena pesada que contiene FDGNYGYAMDY (SEC ID N.º 17);
- una CDR1 de cadena ligera que contiene RSSTGAVTTSNYAN (SEC ID N.º 18);
- 15 una CDR2 de cadena ligera que contiene GTNNRAP (SEC ID N.º 19); y
- una CDR3 de cadena ligera que contiene ALWYSNHWVFGGGTKL (SEC ID N.º 20).
- 20 2. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:
- i) una región variable de cadena pesada que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 24 o la SEC ID N.º 14; y/o
- 25 ii) una región variable de cadena ligera que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N.º 28, la SEC ID N.º 32 o la SEC ID N.º 8.
3. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende:
- 30 i) una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 28; o
- ii) una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 24 y una región variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 32; o iii) una región variable de cadena pesada que contiene la SEC ID N.º 14 y una región
35 variable de cadena ligera que contiene la SEC ID N.º 8.
4. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo.
- 40 5. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico.
6. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un
45 anticuerpo monovalente.
7. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgM o IgG; preferiblemente en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 o un anticuerpo IgG2.
- 50 8. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo:
- i) es el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente PTA-9405 («52M51») o una versión humanizada del mismo;
- 55 ii) está codificado por el polinucleótido depositado en la ATCC como Depósito de Patente PTA-9549 («52M51 H4L3»).
9. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende la administración de al menos un agente terapéutico adicional, en el que:

i) preferiblemente, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico; o

ii) preferiblemente, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo terapéutico adicional, como un anticuerpo que se une específicamente a un segundo receptor Notch, o a un ligando del receptor Notch.

10. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico.

10 11. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo se administra:

i) después de radioterapia; o

15 ii) con radioterapia.

12. El uso del anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda, el linfoma de Hodgkin, el mieloma múltiple o la leucemia linfoblástica aguda de células T.

20

13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

1A

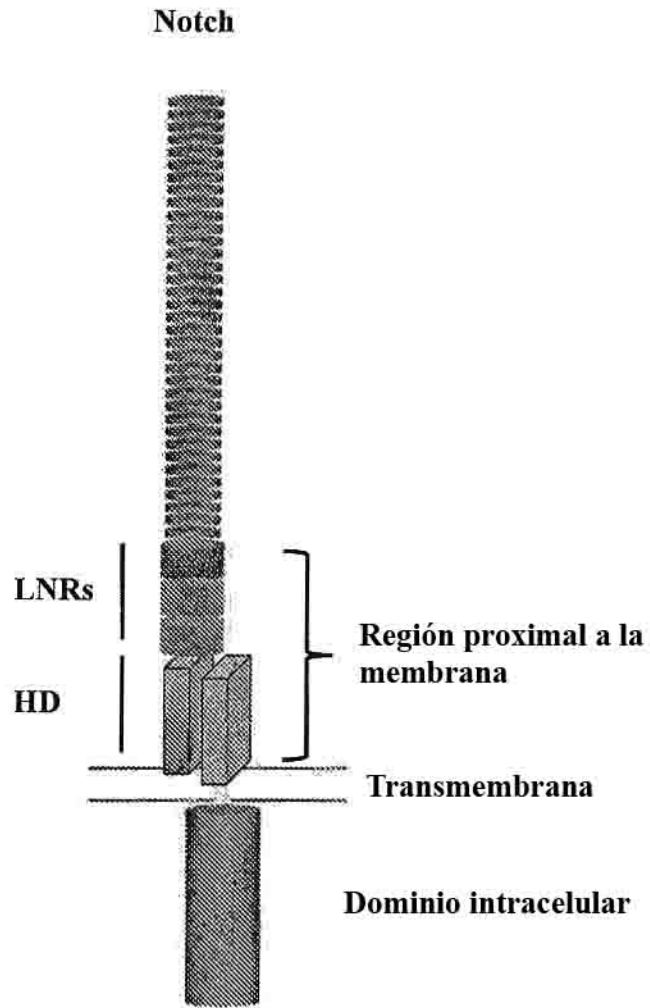
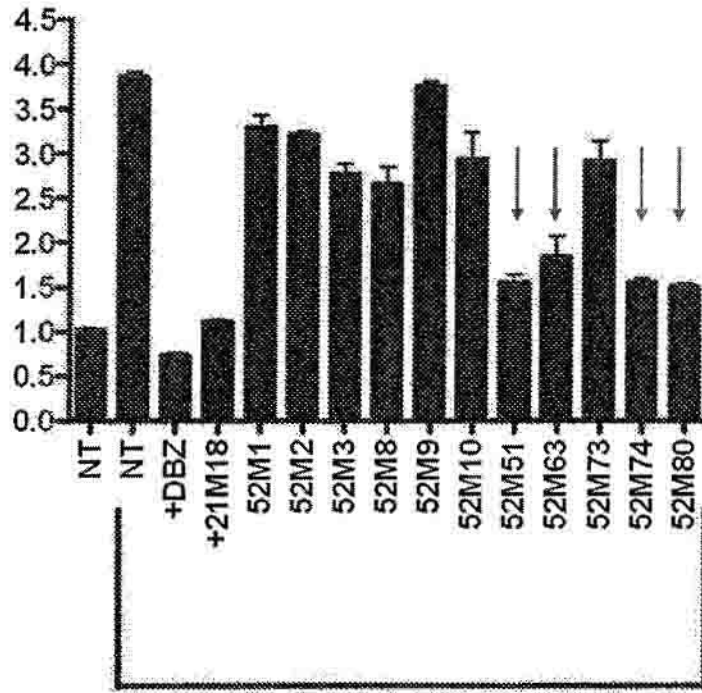


Figura 1

1B



+ hDLL4-fc 200 ng por pocillo

1C

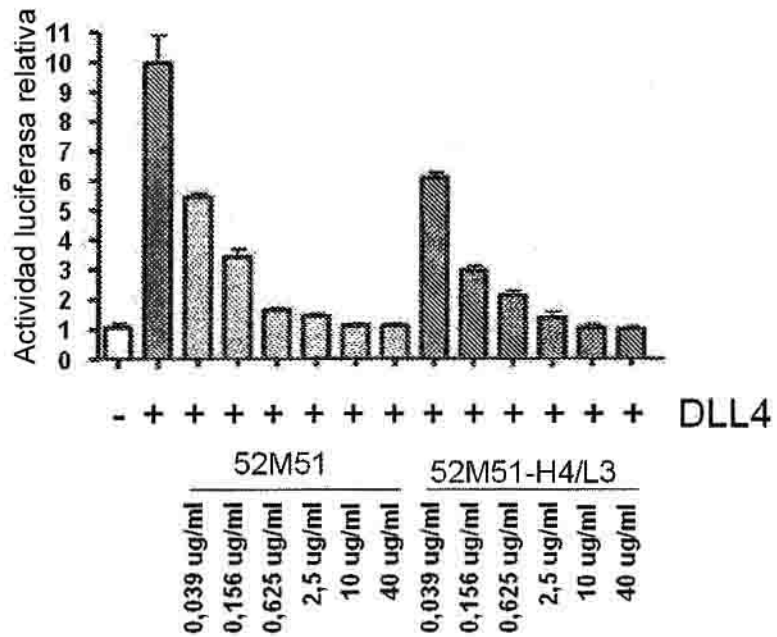


Figura 1

1D

AcMo frente al Antígeno-52 de Notch1 (región proximal a la membrana)

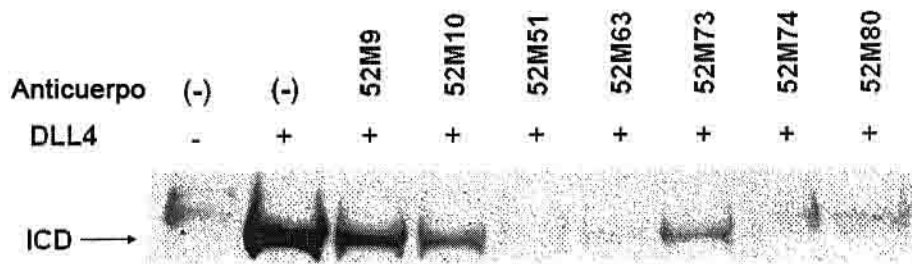


Figura 2

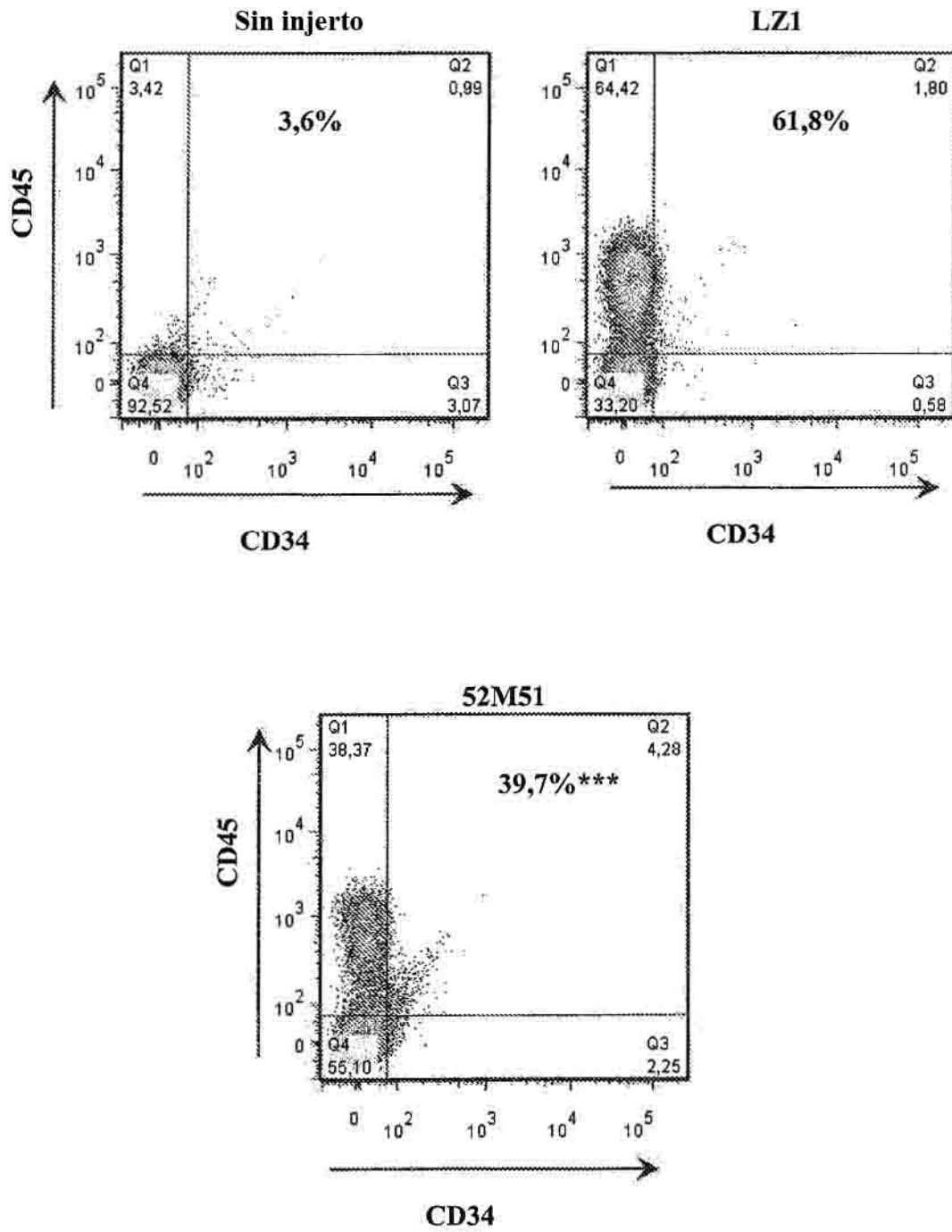


Figura 3

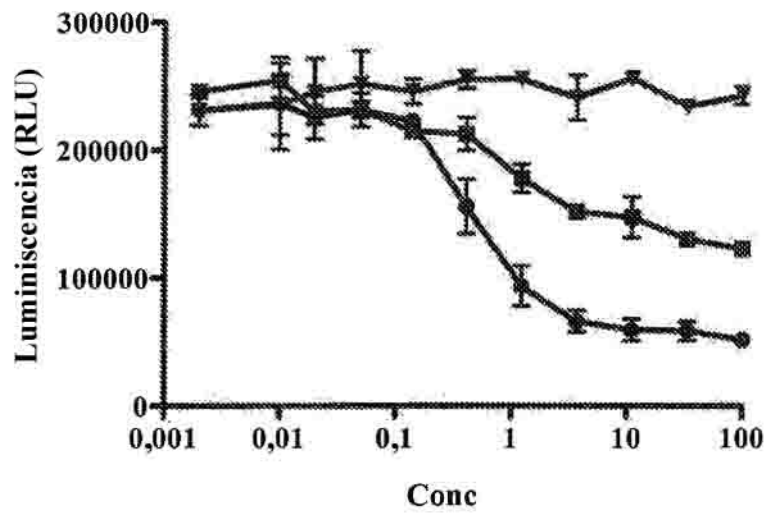


Figura 4

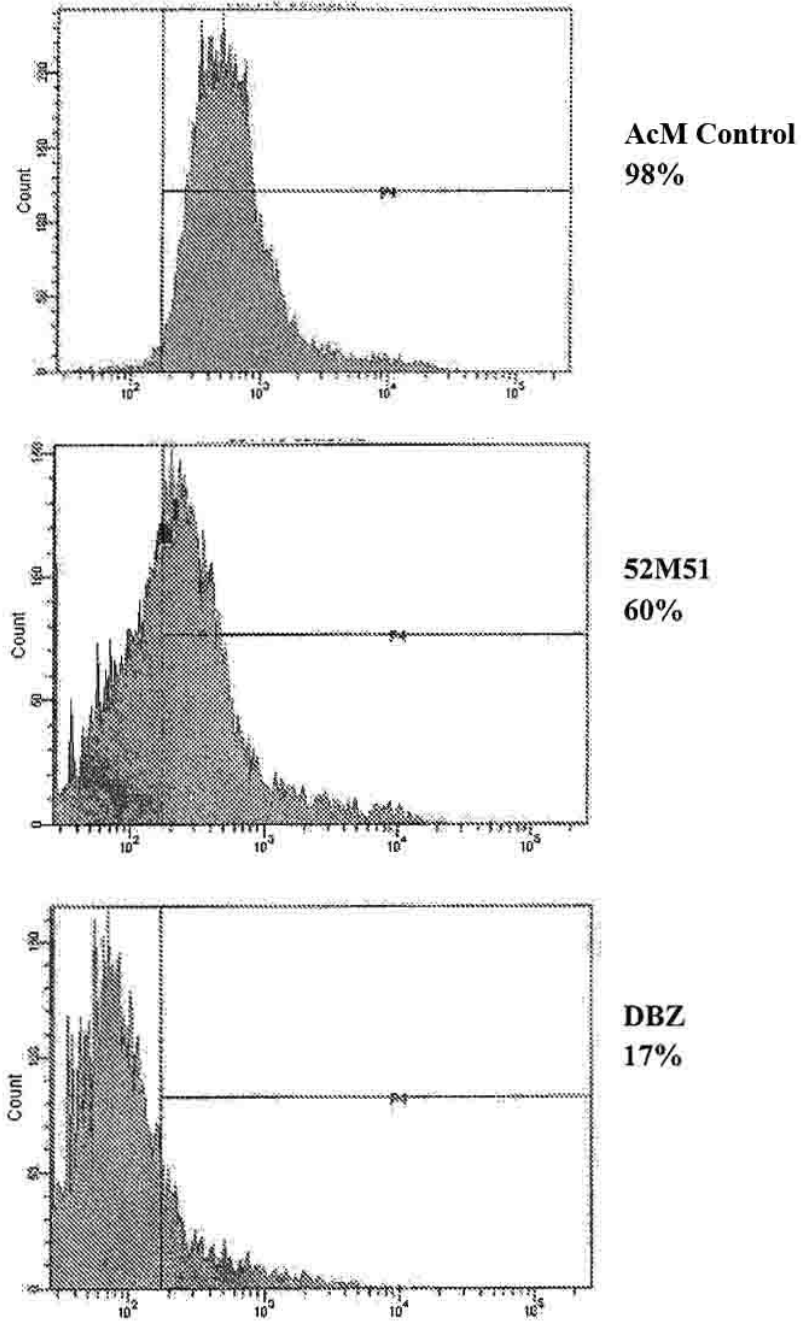


Figura 5

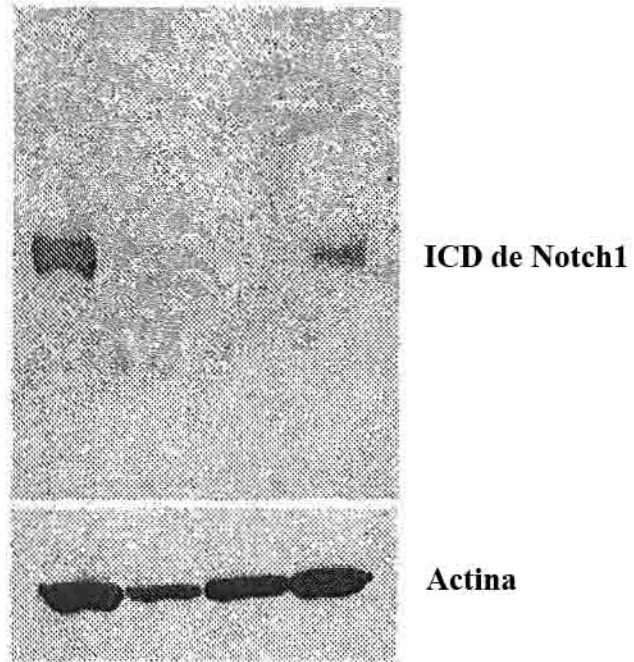


Figura 6

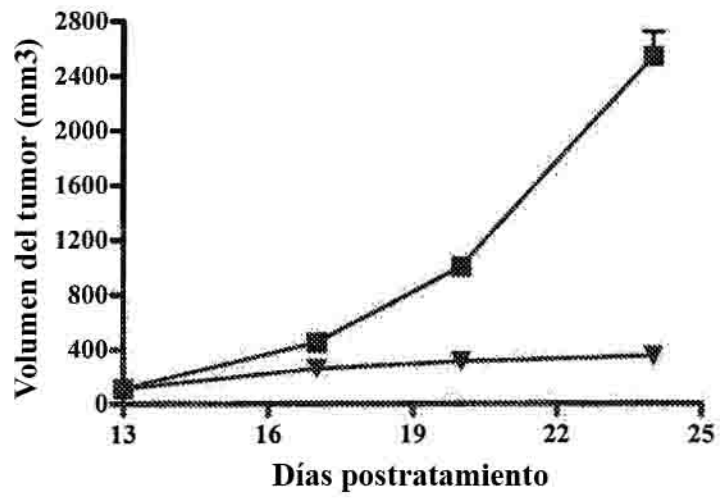


Figura 7

