

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 244**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2014 PCT/GB2014/050104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2014 E 14701426 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2945968**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a Jagged 1**

30 Prioridad:

15.01.2013 GB 201300706

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

09.09.2019

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD
(100.0%)**

**Angel Building 407 St John Street
London, EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**BANHAM, ALISON HILARY;
HARRIS, ADRIAN LLEWELLYN;
HANDFORD, PENELOPE ANN y
LEA, SUSAN MARY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 724 244 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

Anticuerpos que se unen a Jagged 1

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a anticuerpos terapéuticos que se unen a Jagged 1, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y a los usos de dichos anticuerpos en terapia.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer en sus diversas formas, es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, y el fracaso en tratar con eficacia a muchos pacientes que padecen estas enfermedades impulsa la búsqueda continuada de nuevas estrategias de tratamiento. La angiogénesis es un proceso fisiológico por el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Es un proceso vital en el desarrollo y el crecimiento normales, pero también desempeña un papel crucial en trastornos patológicos, tales como el cáncer, ya que proporciona la vasculatura necesaria para suministrar oxígeno y nutrientes al tumor en crecimiento. La angiogénesis está regulada por la interacción compleja entre muchas vías, tales como las controladas por VEGF y Notch. La importancia clínica de la angiogénesis ha establecido firmemente este proceso como una diana lógica para la terapia del cáncer [1, 2].

15 El transporte dirigido a la angiogénesis tumoral de anticuerpos anti-VEGF ha sido una estrategia que ha tenido éxito, habiéndose concedido la licencia al bevacizumab para varios tipos de tumores, como agente individual o en la terapia de combinación [3]. Sin embargo, muchos pacientes no responden o su respuesta es temporal [1]. También se han intentado establecer como diana otros componentes de la vía de VEGF, que ha incluido la utilización de anticuerpos contra VEGFR1, VEGFR2, receptores de neuropilina y PLGF [4]. Hay que mencionar que la toxicidad de los anticuerpos es mucho menor que la de los inhibidores de molécula pequeña dirigidos a VEGFR, lo cual implica lograr una especificidad mucho mayor y menos efectos sobre aquello que no constituye la diana.

20 La vía de Notch se ha implicado en la homeostasis vascular y la formación de patrones vasculares y en la angiogénesis patológica, lo cual ha provocado que se investigue su modulación para obtener un beneficio terapéutico [5]. La señalización de Notch está mediada por receptores unidos a membrana (Notch1-4) y ligandos (DII1, 3 y 4, y Jagged 1 y 2). En efecto, Notch1, Notch3, Notch4, DII1, DII4 y Jagged1 son expresados en células de la vasculatura, y los ratones con Notch1 [6], DII1 [7] y Jagged 1 [8] inactivados son letales en estado embrionario debido a defectos vasculares, mientras que DII4 es haploinsuficiente [9], lo cual sugiere que la señalización de Notch debe ajustarse con precisión para generar una vasculatura totalmente funcional. En efecto, ciertas mutaciones en la vía de Notch están asociadas con enfermedades humanas que muestran defectos vasculares, como la mutación de NOTCH3 en CADASIL [10] y la mutación de *JAGGED1* en el síndrome de Alagille [11].

25 La unión de un ligando de Notch, a través de su dominio Delta/Serrate/Lag2 (DSL), a la región EGF11-12 de un receptor Notch activa la ruptura proteolítica del receptor y libera su dominio intracelular (NICD). Este procesamiento requiere la actividad de dos proteasas, concretamente la enzima convertora del factor α de necrosis tumoral (TACE) y la presenilina/ γ -secretasa (un complejo de proteasas grande formado por presenilina 1 o 2, así como nicastrina, Pen-2 y Aph-1). La posterior translocación nuclear de NICD provoca la activación transcripcional de genes de las familias Hes/E(spl) and Hey/Hesr a través de la interacción de NICD con un miembro de la familia CSL (CBF1, supresor de lampiño, y Lag-1) de factores de la transcripción, también denominado proteína de unión a la secuencia señal de recombinación (RBP-Jk) y una proteína similar a Mastermind activadora transcripcional (MAML). A su vez, las proteínas Hes y Hey, que son represores transcripcionales, inhiben la expresión de genes que provocan que las células adopten un destino diferenciado [12].

35 Además de desempeñar un papel crucial en la angiogénesis, la vía de Notch también está implicada en una vía oncogénica en células tumorales, en donde ayuda a mantener las poblaciones de células madre, estimula la supervivencia celular, inhibe la apoptosis y puede provocar la proliferación celular (analizado en [13]). Se han indicado mutaciones activadoras en *NOTCH1* en aproximadamente 56% de las leucemias linfoblásticas agudas de células T ("T-cell acute lymphoblastic leukaemias", T-ALL) [14], en donde actúan principalmente para inducir la activación independiente de ligando del receptor o para mutar el dominio PEST y, así, aumentan la estabilidad del dominio intracelular de Notch 1 (NICD). También se han identificado mutaciones activadoras de *NOTCH1* en la leucemia linfocítica crónica de células B ("B-cell chronic lymphocytic leukaemia", B-CLL) [15, 16] y en el linfoma de las células del manto [17], y estas anomalías se han correlacionado con una mala prognosis, lo cual sugiere que definen un subtipo clínico diferenciado para la intervención terapéutica. Se han detectado mutaciones *NOTCH2* en 8% de linfomas difusos de células B grandes ("diffuse large B-cell lymphomas", DLBCL) y se ha demostrado funcionalmente que son mutaciones de ganancia de función [18]. También se ha indicado una señalización anómala de Notch sin pruebas de lesiones genéticas en tumores sólidos, que incluyen cánceres de mama, renal, pancreático, de próstata, cervical, endometrial, de cerebro, intestinal, de pulmón y de piel [19]. Las funciones pleiotrópicas de Notch significan que esta vía también puede desempeñar papeles supresores de tumores en ciertos contextos (analizado por [20, 21]). Sin embargo, en la inmensa mayoría de los casos, la señalización de Notch estimula el crecimiento tumoral.

Por tanto, la inhibición de Notch sigue siendo una nueva estrategia prometedora para la terapia del cáncer y parece que pueda ser particularmente útil en combinación con otros agentes, incluyendo la radioterapia y la quimioterapia [13]. Ciertos estudios tempranos de la inhibición de pan-Notch con inhibidores de γ -secretasa muestran toxicidad gastrointestinal, mientras que un tratamiento prolongado con anticuerpos anti-DII4 conduce al desarrollo de tumores basados en célula vasculares/endoteliales similares al hemangioblastoma (analizado por [13]). En fechas más recientes, ciertos anticuerpos que inhiben funcionalmente receptores Notch individuales han mostrado efectos antitumorales sin toxicidad intestinal [22, 23]. Otros análisis dirigidos a genes específicos del intestino inducibles para estudiar el papel de los ligandos de Notch individuales han demostrado que es necesaria la señalización de Notch mediada por DII1 y DII4 para la homeostasis de células madre intestinales, mientras que la delección de Jagged 1 no altera el epitelio intestinal [24]. Así, debería ser posible actuar sobre la señalización activada por Jagged 1 a través de múltiples receptores Notch sin efectos adversos sobre la toxicidad gastrointestinal.

DII4 se expresa en gran cantidad en la vasculatura tumoral e influye en el crecimiento tumoral mediante la regulación de la angiogénesis tumoral en modelos de xenoinjerto [25-28], produciendo menos vasos, pero más funcionales. El bloqueo de la señalización de DII4, por la expresión de DII4 soluble o anticuerpos anti-DII4, disminuye el crecimiento tumoral incluso en tumores resistentes a la inhibición de VEGF [25], lo cual confirma esta vía como una diana terapéutica. De manera interesante, la señalización de DII4 induce la expresión de Jagged 1 [29]. Esto sugiere que este último ligando de Notch puede ser un efector corriente abajo crucial de la señalización de Notch-DII4 en la angiogénesis tumoral. Además, se ha descrito una excesiva señalización de Notch debido a unos altos niveles de expresión de los receptores de Jagged 1 y Notch en diversos cánceres. Por ejemplo, la sobreexpresión de Jagged 1 y Notch 1 en el cáncer de mama está asociada con una baja supervivencia global con un efecto sinérgico de coexpresión de alto nivel [30]. Además, la expresión de Jagged 1 en células de carcinoma de células escamosas induce la angiogénesis y, de los cuatro receptores, se sabe que Notch 1 es crucial para la angiogénesis en adultos [31, 32]. De manera interesante, se ha demostrado que la señalización de Notch activada por Jagged 1 desde las células del cáncer al endotelio induce la angiogénesis, generando vasos que son más pequeños que los inducidos por DII4.

La mayoría de los vasos sanguíneos en el organismo adulto consisten en al menos dos tipos de células, las células endoteliales ("endothelial cells", EC) y las células murales (pericitos o células del músculo liso vascular, "vascular smooth muscle cells", VSMC). Los pericitos se enrollan alrededor del endotelio y desempeñan un papel crucial en la estabilización y las funciones hemodinámicas de los vasos sanguíneos resultantes. En años recientes, ambos tipos de células, EC y pericitos, se han localizado con eficacia con el fin de privar de oxígeno a los tumores sólidos. De manera interesante, se ha demostrado que la señalización de Notch es crucial para el desarrollo de ambos tipos de células [5].

El reclutamiento de pericitos y células del músculo liso vascular (VSMC) hacia los vasos en formación es una etapa crucial para la maduración de los vasos y para que las células endoteliales vuelvan a la quiescencia. Hace una década se demostró que los pericitos estabilizan los vasos sanguíneos inmaduros, finalizando con el periodo de plasticidad de la remodelación de los vasos [33]. Además, una alta cobertura de los vasos por los pericitos es fundamental para estabilizar los vasos tumorales. Unos vasos tumorales inmaduros o con poca cobertura son extremadamente dependientes de la señalización de VEGF-A/VEGFR2 y, por tanto, son vulnerables a terapias anti-VEGF, tales como bevacizumab. Sin embargo, hasta la fecha no se comprenden totalmente los mecanismos subyacentes a la supervivencia del resto de la vasculatura tras las terapias anti-VEGF. Parece que el resto de los vasos tienen una mayor cobertura de pericitos, lo cual sugiere que este tipo de célula puede limitar la eficacia de estas terapias antiangiogénicas [34, 35]. De manera interesante, la delección específica de EC de Jagged 1, que en fechas recientes ha demostrado inducir letalidad embrionaria y defectos cardiovasculares, no es debida a una señalización defectuosa de Notch 1 en EC o durante la diferenciación arterial-venosa. Al contrario, se ha asociado la delección de la expresión de Jagged 1 en EC con una baja cobertura de vasos por VSMC, que posteriormente provoca la detención en desarrollo de los embriones mutantes [36]. Así, basándose en su función como regulador de la cobertura de los vasos, la vía de señalización Notch/Jagged 1 se presenta como una diana atractiva que debería tener un notable beneficio terapéutico para el tratamiento de tumores sólidos, en particular cuando se emplea en combinación con terapias anti-VEGF. Por tanto, los anticuerpos dirigidos a bloquear la señalización de Notch-Jagged 1 podrían provocar un beneficio terapéutico dirigiéndose al tumor en tres niveles diferentes, concretamente, células endoteliales, células murales y células tumorales.

Las células T reguladoras ("regulatory T cells", Treg) se infiltran en tumores en una enorme gama de tipos de tumores. Su número a menudo es clínicamente importante, y las Treg desempeñan una diversidad de papeles, que incluyen su capacidad para suprimir la inmunidad antitumoral y para estimular la angiogénesis (analizado recientemente en [80, 81]). La sobreexpresión de J1 en células que presentan antígenos puede inducir Treg específicas de antígenos humanos y modificar la respuesta inmunológica a antígenos víricos [82]. Los ligandos de Notch, tales como J1, también aparecen sobreexpresados en Treg, y el bloqueo de la señalización de Notch usando anticuerpos que se dirigen a J1 o N1 inhibe la función supresora de Treg [83]. Además, la preexposición de células T efectoras CD4+CD25- a J1 aumenta significativamente su sensibilidad a la supresión mediada por Treg [84]. Así, la actuación sobre J1 en poblaciones de células inmunorreguladoras en el microentorno tumoral también ofrece la oportunidad de mejorar la respuesta inmunológica del hospedante frente a antígenos tumorales.

Existen nuevas pruebas que sugieren que Jagged 1 también puede ser un ligando para un receptor distinto de la familia de Notch. CD46 (MCP) es una glicoproteína transmembrana de tipo I humana expresada de modo ubicuo que se descubrió originariamente como una proteína reguladora del complemento y después como un receptor de entrada a la célula que permite la infección vírica. De modo interesante, el transporte dirigido vírico a tumores empleando su elevada expresión de CD46 como receptor de entrada selectivo de tumor se ha empleado como estrategia para facilitar la terapia y la formación de imágenes de múltiples tipos de cánceres [37]. Las aplicaciones anticáncer incluyen la localización directa a células del cáncer de efectos citopáticos inducidos víricamente y la formación de sincitios [38], que incluyen cáncer de mama [39], meduloblastoma [40], glioma [41] y cáncer de ovario recurrente [42]; la localización de la terapia génica en adenocarcinomas de pulmón [43]; y la radioviroterapia en cáncer de próstata [44]. En fechas más recientes, se ha identificado un papel inmunomodulador en la coestimulación de células auxiliares T de tipo 1 (T_H1) efectoras que segregan interferón- γ y su posterior cambio a células T reguladoras productoras de IL-10 (analizado en [45]).

Existe un considerable bibliografía con respecto al sistema del complemento y el cáncer, tal como se ha analizado recientemente [46, 47]. La mayoría de los tumores expresan reguladores solubles o receptores del complemento unidos a membrana (CD35, CD46, CD55 y CD59) sobre la superficie celular, suprimiendo con ello la activación del sistema del complemento y disminuyendo su papel en la eliminación del tumor. Se ha establecido claramente que la sobreexpresión de CD46, CD55 y CD59 en tumores los protege de la lisis del complemento directa. Además, los anticuerpos terapéuticos (tales como rituximab) usan la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) para matar a las células tumorales, y esta actividad puede aumentar localizando los receptores del complemento unidos a membrana, por ejemplo, usando anticuerpos de bloqueo.

Se ha descrito en muchos casos la sobreexpresión de CD46, y los ejemplos incluyen una expresión sobreexpresada en 77% de los cánceres de vejiga [48] y una alta expresión en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [49]. La expresión de CD46 es más abundante en células de mieloma múltiple primario que en células hematopoyéticas normales de diversos linajes en la médula ósea [50]. La inactivación mediada por ARNi de CD46 inhibe significativamente el crecimiento de las células del cáncer de páncreas que sobreexpresan CD46 [51]. Aunque los cánceres de mama con expresión de CD46 tienen una prognosis menos favorable [52], también es el caso de los pacientes con cáncer de ovario CD46+ [53]. La infrarregulación de CD46 en las líneas de células de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231 por microARN induce la opsonización de las células del cáncer a través de una vía alternativa que provoca la activación de complemento [54]. La localización con ARNi de CD46 en células Du145 (próstata), BT474 (mama) y K562 (eritroleucemia) también aumenta significativamente la opsonización de C3 [55]. Aunque la localización con ARNh de CD46 y DAF potencia la lisis mediada por el complemento en células de cáncer cervical [56], para complementar el ataque se emplean oligonucleótidos de fosforotioato antisentido para infrarregular las células tumorales sensibilizadas a CD55 y CD46 [57].

Algunas actividades biológicas de CD46 no pueden explicarse a través de su interacción con ligandos conocidos, por ejemplo, C3b, y por tanto se especula que existe otro ligando para este receptor. En un estudio reciente, se ha demostrado que la activación de CD46 en células T CD4+ regula la expresión de Notch y sus ligandos y, además, se ha identificado a Jagged 1 como otro ligando fisiológico para CD46 [45]. Otra prueba de la importancia de esta interacción consiste en que los pacientes con mutaciones en genes que codifican CD46 o Jagged 1 comparten características biológicas clave, que incluyen infecciones recurrentes. Aunque en estos pacientes no se vio afectada la proliferación de células T ni la función efectora de células T_H2, la inducción *in vitro* (o regulación) de células T_H1 se ve gravemente comprometida o está ausente y parece que implica una respuesta alterada a citoquinas de la familia de IL-2. El fenotipo de receptor de la superficie celular más significativo fue la desregulación de componentes del receptor de IL-7, CD127 y CD132, lo cual es necesario para la homeostasis de células T y la potenciación de las respuestas de T_H1 y T_H17. También se sabe que CD127 es un locus de alto riesgo para la esclerosis múltiple, independientemente del complejo de histocompatibilidad mayor.

El sitio de unión de Jagged 1 se localizó en los dominios CCP1 y CCP2 de CD46; habitualmente, a estos dominios se unen a ligandos víricos, tales como proteínas knob de adenovirus o hemaglutinina del virus del sarampión. Esta unión de Jagged 1 está mediada por un fragmento de DSL-EGF3 de Jagged 1 recombinante que comprende el dominio DSL y los primeros tres dominios similares a EGF, lo cual demuestra que los sitios de unión a CD46 y Notch 1 en Jagged 1 están localizados en la misma región de la proteína. Los experimentos de resonancia de plasmón de superficie para medir la capacidad de unión de las interacciones de Jagged 1 sugieren que CD46 muestra una interacción más fuerte con Jagged 1 que la proteína de fusión Notch 1 soluble (EGF11-13). Esto resulta coherente con los datos que sugieren que la presencia de CD46 sobre la superficie de las células T restringe las interacciones de Notch 1 y Jagged 1. Por tanto, existe un diálogo importante entre los sistemas del complemento y de Notch que es necesario para la función de las células T efectoras y que puede desempeñar un papel clave en otros procesos biológicos, en particular el cáncer.

Por tanto, los anticuerpos anti-Jagged 1 que se dirigen al dominio DSL y/o a las primeras tres repeticiones de EGF también pueden bloquear la interacción entre CD46 y Jagged 1. Aunque algunos efectos terapéuticos pueden mediar a través del sistema de Notch, estos reactivos también pueden dirigirse a otras vías que implican a CD46.

El dominio extracelular de Jagged 1 posee características estructurales compartidas con todos los ligandos de Notch, como son la presencia de un dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) y un número variable de dominios similares

al factor de crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor", EGF). Los estudios cristalográficos del fragmento funcional de Jagged 1 humana (DSL-EGF1-3) en combinación con la mutagénesis informada por estructura, revelan que los restos 199-207 del dominio DSL desempeñan un papel crucial en la unión de Notch (Cordle *et al.*, 2008 [65]). El mismo estudio cartografía el sitio de interacción predominante en Notch 1 con el dominio EGF12.

5 El documento US 2008/0317760 describe una serie de anticuerpos monoclonales generados en ratones contra los restos 24-1060 de Jagged 1 humana, con un cartografiado de epitopos hasta el dominio EGF1. Se identificó un anticuerpo capaz de inhibir la asociación de Jagged 1-Notch 1 y de reducir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto murino. Por tanto, es evidente que, en el contexto de la terapia basada en anticuerpos, la localización del dominio DSL de Jagged 1 humana no es fundamental para la inhibición de la unión a receptores endógenos, tales como Notch, y por tanto de la señalización mediada por Jagged 1 infrarregulada.

10 El documento WO 2011/063237 describe otros anticuerpos monoclonales anti-Jagged 1, en este caso generados mediante la inmunización de ratones con los restos 1-1060 de Jagged 1 de ratón y la identificación de fragmentos F_{ab} de reconocimiento del dominio extracelular de Jagged 1 humana a partir de un banco sintético empleando la presentación con fagos. Se descubrió que estos se unen a Jagged 1 humana y de ratón con afinidad similar, y todos menos uno reconocen a Jagged 2 humana. Además, varios anticuerpos evitaron la unión de Jagged 1 humana a Notch 2 humano, inhibieron la señalización mediada por Jagged y redujeron el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto murinos. Sin embargo, los epitopos reconocidos por los anticuerpos descritos en el documento WO 2011/063237 no se cartografiaron hasta una región o dominio diferenciado dentro de la proteína Jagged 1.

15 A la luz de la técnica anterior, existe una base para proporcionar un anticuerpo monoclonal anti-Jagged 1 terapéutico que reconoce un epitopo definido sobre Jagged 1 humana, que además es un epitopo diferenciado de los dominios EGF, y que inhibe la señalización mediada por Jagged 1 y el crecimiento tumoral con una eficacia adecuada para su uso en terapia. Dada la aparición bien documentada de resistencia adquirida a productos terapéuticos para el cáncer debido a mutaciones de restos individuales, por ejemplo, en casos de leucemia mieloide crónica resistente a imatinib [85], la proporción de un anticuerpo terapéutico con un epitopo definido que se sabe que se diferencia del reconocido por un anticuerpo preexistente contra la misma diana tiene valor terapéutico en el contexto de una terapia de combinación. Además, se ha indicado previamente la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales entre los dominios EGF de diferentes proteínas, por ejemplo, en el caso de CD97 y EMR2 [86].

20 Por consiguiente, son necesarios más anticuerpos capaces de inhibir la interacción entre Jagged 1 humana y Notch/CD46 a través de la unión a un epitopo definido sobre Jagged 1, preferiblemente un epitopo que se diferencia de los dominios EGF.

Sumario de la invención

25 La presente invención se basa en la identificación y la caracterización molecular de anticuerpos que se unen al dominio Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) de Jagged 1 humana (también denominado Jag1 o J1) a través de nuevos epitopos. Dichos anticuerpos bloquean con eficacia las interacciones entre Jagged 1 humana-receptor e inhiben la señalización mediada por Jagged 1 *in vitro* en líneas de células tumorales, indicando así su idoneidad para su uso en la terapia del cáncer.

30 Cordle *et al.* (2008) determinaron que los restos 199-207 del dominio DSL de Jagged 1 humana desempeñan un papel crucial en la unión del receptor Notch [65]. Por tanto, los presentes inventores se sorprendieron de poder generar una serie de anticuerpos con las anteriores propiedades deseables que reconocen epitopos que solo pueden definirse en común como que comprenden el resto E228 del dominio DSL.

35 Según un primer aspecto de la invención, la presente invención proporciona un anticuerpo que reconoce específicamente un epitopo que comprende una porción del dominio de secuencia consenso Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) de Jagged 1 humana y que bloquea la interacción entre Jagged 1 humana y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en la familia Notch y CD46; en el que dicho dominio DSL de Jagged 1 humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y en el que dicha porción del dominio DSL de Jagged 1 humana comprende el resto E228.

Según un segundo aspecto de la invención, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, según se definió anteriormente, junto con un diluyente, excipiente, adyuvante farmacéuticamente aceptables y/o al menos otro agente terapéutico.

40 Según un tercer aspecto de la invención, la presente invención proporciona un anticuerpo o una composición farmacéutica, según se describió anteriormente, para su uso en terapia.

Según un cuarto aspecto de la invención, la presente invención proporciona un hibridoma que comprende y/o que segrega un anticuerpo según se describió anteriormente.

45 Según un quinto aspecto de la invención, la presente invención proporciona una célula o una línea celular que expresa un anticuerpo, según se describió anteriormente, en forma recombinante.

Según un sexto aspecto de la invención, se proporciona un vector de expresión capaz de expresar un anticuerpo de la invención.

Breve descripción de las figuras

La invención se describe remitiéndose a los dibujos adjuntos, en los que:

5 Figura 1. Muestra el bloqueo de la unión de Notch 1 (N1) a células que expresan Jagged 1 (J1) (A), y el bloqueo de la unión de CD46 a una proteína J1 recombinante (B) por anticuerpos monoclonales de J1 (mAb). (A) Los 21 sobrenadantes de hibridoma que reconocen a J1 de la superficie celular se seleccionaron mediante citometría de flujo por su capacidad para bloquear la interacción entre J1 humana de longitud completa expresado en células (hJ1; transfectantes de HEK293) o J1 murina (mJ1; transfectantes de B16F10) y la proteína recombinante soluble N1-EGF11-13 biotinilada unida a esferas revestidas con avidina (la línea fina indica la unión). No se observó unión con una proteína control cbEGF12-14 procedente de fibrilina1 humana (zonas grises). Cuatro anticuerpos bloquean total (J1-65D, J1-156A, J1-183D) o parcialmente (J1-187B) la unión de N1 humano a J1 humana, lo cual se observa cuando la línea gruesa se solapa con las zonas grises o se desplaza alejándose de la línea fina y hacia las zonas grises. El anticuerpo denominado J1-142B no es un anticuerpo según la presente invención, pero muestra un bloqueo parcial de la unión de mJ1-N1 como control positivo. (B) Ensayo ELISA de la interacción de CD46 inmovilizado (CCP1-CCP3) con J1 DSL-EGF3 biotinilado (barra negra) y en presencia de sobrenadantes de hibridoma positivos a FACS (barras grises). Los ensayos control (barras más a la izquierda y a la derecha), representados por un rayado en diagonal) contienen solo CD46 o J1 DSL-EGF3 biotinilado. Los mAb que bloquean a Notch 1/Jagged 1, J1-65D, J1-156A, J1-183D y J1-187B, se indican con asteriscos. En este ensayo ELISA se observaron efectos inhibidores variables de los anticuerpos de bloqueo. Sin embargo, son necesarios ensayos basados en células con Jagged 1 de longitud completa expresada nativa para verificar sus efectos sobre la interacción de J1/CD46.

Figura 2. Muestra la tinción inmunocitoquímica de transfectantes de J1 y J2 con mAb de J1. Preparaciones citocentrifugadas de células HEK293 transfectadas con un vector vacío (293) o plásmidos que codifican J1 humana de longitud completa o Jagged 2 (J2) se inmunotifieron con sobrenadantes de hibridoma que contenían los mAb de J1. Se empleó un anticuerpo comercial contra J2 como control positivo para confirmar la transfección y la expresión de J2 recombinante (abajo a la derecha). Ninguno de los mAb de J1 mostró reactividad cruzada con J2 mediante marcaje con inmunoperoxidasa.

Figura 3. Muestra un análisis FACS de la especificidad por el ligando Notch de los mAb de J1. Células HEK293 transfectadas con J1 o J2 humana y células B16F10 transfectadas con DLL4 humana (hDLL4) o mJ1 se tiñeron para FACS con mAb de J1 (10 µg/ml), seguido de un Ab secundario anti-APC de ratón. Todos los anticuerpos tiñeron a J1 humana, mientras que solo se observó una débil reactividad cruzada de especies con mJ1 en J1-65D y J1-183D. No se observó una unión significativa a hDLL4, mientras que se observó una unión débil a J2 con J1-156A y J1-187B. La expresión de J2 sobre la superficie celular se confirmó usando un anticuerpo comercial; la expresión de hDLL4 y mJ1 se confirmó mediante la detección de la coexpresión de GFP. El anticuerpo denominado J1-142B no es un anticuerpo según la presente invención, pero actúa como control positivo, demostrando la presencia de mJ1 en la superficie celular de los transfectantes de B16F10.

Figura 4. Muestra la especificidad de unión de especies ortólogas de mAb de J1. (A) El dominio DSL y las 3 repeticiones de EGF adyacentes (DSL-EGF3) con secuencias que se corresponden con proteínas de J1 humana (hJ1), murina (mJ1), de conejo, de cobaya y de rata (rJ1) fueron expresados sobre la superficie celular mediante la fusión con parte de la molécula de CD1b. Se añadió un marcador FLAG N-terminal y un marcador GFP C-terminal. (B) Se transfectaron células HEK293T con las anteriores construcciones híbridas y las células se tiñeron 48 h después. Se comparó la intensidad de la unión de los mAb (MFI) con la de la tinción de mAb anti-FLAG en la misma muestra (n = 2). (D) Después, el experimento ilustrado en el panel B se repitió para comparar la unión del anticuerpo a las proteínas de J1 humana, murina o de rata. (C) Alineamiento de secuencias DSL-EGF3 entre especies. (E) Células adherentes primarias procedentes del bazo de ratas se inmunotifieron con mAb conjugado con APC J1-65D o J1-183D y se detectó la expresión de Jagged 1 mediante FACS. El anticuerpo denominado J1-142B no es un anticuerpo según la presente invención, pero actúa como control positivo, ejemplificando el reconocimiento específico de mJ1.

Figura 5. Muestra la tinción de J1 endógeno y la inactivación de la expresión de la proteína de J1 por ARNhc. Células MDA-MB-231 fueron transducidas con lentivirus que codifican ARNhc de J1 Mission y se detectó el nivel de expresión de J1 mediante FACS en el día 7 después de la transducción. El ARNhc de J1 inactivó con éxito la expresión de Jagged-1, tal como se visualiza mediante la tinción del mAb de J1.

Figura 6: Muestra el cartografiado de epitopos para mAb de J1. (A) Selección con ELISA de mAb que se unen al dominio DSL de J1. Se seleccionaron sobrenadantes de hibridoma mediante ELISA para la unión a proteínas recombinantes de J1 solubles expresadas en bacterias y replegadas *in vitro* que comprenden el dominio DSL solo (DSL) y/o el dominio DSL y las primeras tres repeticiones de EGF (DSL-EGF3). De los 21 anticuerpos positivos a FACS, 13 fueron capaces de unirse al dominio DSL solo, de los cuales solo cuatro mostraron actividad de bloqueo. (B) Cartografiado de transferencia por puntos de epitopos de mAb de J1. Los aminoácidos clave dentro del dominio

DSL fueron mutados y se emplearon proteínas recombinantes de DSL-EGF3 solubles en transferencias por puntos para identificar los aminoácidos responsables de la unión a mAb. Se emplearon mAb de bloqueo (mostrados en el panel izquierdo) a una dilución de 1:500 de sobrenadante de hibridoma y 10 ng de proteína mutante.

5 Figura 7. Muestra el cartografiado de epitopos para identificar la base molecular para la unión preferente a J1 humana. (A) Restos en el dominio DSL de J1 humana y primer resto del dominio EGF1 que están sustituidos en J1 de ratón. Nótese la proximidad de estos restos (Y190, E228 del dominio DSL, y R231 del dominio EGF1) a los restos que se ha demostrado que son importantes para la unión a Notch (F199, R201, R203, R207). (B) Cartografiado de transferencia por puntos de epitopos de mAb de J1. Los aminoácidos 190 y 228 tienen diferentes identidades de aminoácidos dentro de los dominios DSL de J1 humana y murina. Los aminoácidos humanos en las posiciones 190, 10 228 y 231 fueron mutados a la secuencia murina. Estas proteínas recombinantes de DSL-EGF3 solubles se emplearon en transferencias por puntos para identificar los aminoácidos responsables de la unión preferente de mAb a la proteína humana. Se usaron los mAb purificados J1-65D, J1-156A, J1-183D y J1-187B a una concentración de 0,02 µg/ml para detectar 10 ng de proteína mutante. Se usó el sobrenadante de hibridoma de J1-142B (1:250) para detectar 0,2 µg de proteína. Se empleó la transferencia con anti-His (conjugado Qiagen RGS-His a 1:10.000) para confirmar que se habían cargado cantidades equivalentes de proteína. Los cuatro anticuerpos dirigidos al dominio DSL de J1 de la invención carecen de unión a J1 cuando el resto ácido glutámico humano en el aminoácido 228 se convierte en el resto ácido aspártico murino. El anticuerpo denominado J1-142B, que no es un anticuerpo según la presente invención, demuestran el reconocimiento de esta construcción mutante por un anticuerpo que reconoce específicamente a J1 murina. (C) Los anticuerpos se acoplaron a la matriz de dextrano de un chip CM5 Biacore usando el acoplamiento de aminas primarias, y se hicieron fluir proteínas de Jagged 1 DSL-EGF3 a 100 nM. Toda la unión se indica como una fracción de la unión de la construcción WT Jagged 1 DSL-EGF3 a ese anticuerpo. Los valores indicados con el promedio +/- la desviación estándar calculado a partir de cinco inyecciones independientes. WT = Jagged 1 no mutado de tipo salvaje ("wild type").

15 Figura 8. Muestra mAb de bloqueo de J1 que reconocen epitopos muy relacionados. Células HEK293-J1 estables se tiñeron con mAb de J1 biotinilados en presencia de mAb de bloqueo a las concentraciones indicadas. Los resultados sugieren que los epitopos de mAb son distintos, pero están suficientemente próximos para evitar la unión de múltiples mAb.

20 Figura 9. Muestra mAb de bloqueo de J1 que reprimen la señalización de Notch endógena. (A) La línea de células de cáncer colorrectal LS174T que expresa luciferasa bajo el control del cofactor de Notch RBPJ fue estimulada con proteínas J1 solubles expresadas en células de mamífero (NE3-Fc y NE12-Fc) o una proteína control en presencia de mAb de J1 (10 µg/ml), y se midió la actividad luciferasa. (B) La misma línea que en (A) se estimuló con diferentes ligandos de Notch humanos recombinantes: J1 (NE12-Fc), J2, DLL4 o una proteína control (mIgG2b) en presencia de mAb de J1 (J1-65D y J1-183D) y se midió la actividad luciferasa, probándose la especificidad de ligando de mAb puesto que no se observó inhibición en las estimulaciones de J2 y DLL4. (C) Se cultivaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 con mAb de J1. Se midió el nivel de expresión del gen diana de Notch *HES1* mediante qPCR usando $\beta 2m$ como gen control. En todos los experimentos se empleó el inhibidor de γ -secretasa DBZ como control positivo para la inhibición de pan-Notch, y un mAb control (IgG2b o IgG1) o ningún tratamiento (NT) fueron los controles negativos.

25 Figura 10. Muestra los efectos de un tratamiento con mAb de J1 sobre la señalización de Notch estimulada por el ligando Jagged1 recombinante y murino endógeno. (A) Se cultivaron células B16F10 de melanoma de ratón que expresan de modo estable J1 murina con 10 µg/ml de cada uno de mAb de J1 o un anticuerpo control IgG1 durante 7 días, suplementándose mAb fresco cada 2 días. Se usó el inhibidor de γ -secretasa DBZ (100 Mm) como control para la inhibición de Notch. Las células se recolectaron, se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNc. Se detectaron los niveles de expresión de *Hes1* murino mediante una PCR a tiempo real normalizada a *GAPDH*. El anticuerpo denominado J1-142B no es un anticuerpo según la presente invención, pero actúa como control positivo, demostrando el efecto de un anticuerpo que reconoce específicamente mJ1 y bloquea parcialmente la asociación de mJ1-mN1, en la expresión de *Hes1* murino. (B) Se cultivaron células de cáncer de mama humano (MDA-MB-231) y células endoteliales primarias (HUVEC) sobre placas revestidas con Jagged 1 de rata recombinante (rrJag1-Fc) o una proteína control (mIgG1) en presencia de 10 µg/ml de mAb de J1 o un Ab de control de isotipo. Las células se recolectaron 24 horas después, se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNc. Se analizó la expresión de los genes diana de Notch humanos *HES1* y *HEY2* mediante una PCR a tiempo real y se usó $\beta 2$ -microglobulina como gen control. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

30 Figura 11. Muestra los efectos de la titulación de anticuerpos sobre el crecimiento de tridimensional de MDA-MB-231. Se cultivaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 como esferoides en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de J1-65D (mAb anti-Jagged 1) o un mAb control mIgG1. (A) Curva de crecimiento de esferoides de células tumorales tratadas. Se realizó la cuantificación del tamaño mediante un análisis de imágenes. (B) Se analizó la expresión del gen diana de Notch *HES1* mediante qPCR como lectura de la inhibición de la vía. (C) Análisis de qPCR que estudia el efecto del tratamiento sobre la expresión de la citoquina protumorigénica *IL6*.

35 Figura 12. Muestra la expresión de J1 en líneas de células de cáncer de mama y los efectos del tratamiento con el anticuerpo de J1 sobre el crecimiento tridimensional de esferoides. (A) Expresión de la proteína de la superficie celular J1 en un panel de líneas celulares de cáncer de mama. Se realizó un análisis FACS sobre seis líneas

celulares diferentes usando dos mAb específicos de J1, que demostró una gran variabilidad en los niveles de expresión de J1, desde muy altos (MDA-MB-231) a negativos (T47D). Se empleó la tinción solo con un anticuerpo secundario como control negativo. Las líneas celulares representativas de los diferentes niveles de J1 después se cultivaron en un cultivo tridimensional como esferoides y se trataron con mAb anti-J1 (J1-65D y J1-183D; DBZ: inhibidor de γ -secretasa, control positivo de la inhibición de Notch; mlgG2b: mAb control; NT: ningún tratamiento). Se muestra uno de al menos 2 experimentos independientes. (B) El tratamiento de células MCF7 (casi negativas para J1) no muestra ningún efecto significativo tras el tratamiento con mAb anti-J1. (C) El tratamiento de células MDA-MB-468 (bajos niveles de J1) muestra una reducción significativa del crecimiento tras el tratamiento con uno de los mAb anti-J1 (J1-183D), aunque mucho más suave que el tratamiento de DBZ. (D) El tratamiento de la línea celular de alta expresión de J1 MDA-MB-231 muestra una significativa reducción del crecimiento, tan potente como el tratamiento de DBZ con ambos mAb (J1-65D y J1-183D).

Figura 13. Muestra el análisis de la inhibición del crecimiento tridimensional de MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con mAb de J1. Se cultivaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 como esferoides en presencia del tratamiento (10 mg/ml de J1-65D o J1-183D: mAb anti-Jagged1; DBZ: inhibidor de γ -secretasa; mlgG2b o mlgG1: mAb control) o en ausencia de tratamiento (NT: ningún tratamiento). (A) Imágenes representativas de esferoides en el día 9 del tratamiento. (B) Se analizó la expresión del gen diana de Notch *HES1* mediante qPCR como lectura de la inhibición de la vía. (C) Proliferación, se evaluó el porcentaje de células Ki67⁺ mediante IHC en 3-5 esferoides/tratamiento procedentes de un único experimento. La cuantificación se realizó mediante el análisis de imágenes. Las barras representan el promedio del número de células positivas (%) \pm DE de múltiples esferoides en un único experimento. (D) Análisis FACS de una subpoblación de CD44⁺/CD24⁻ enriquecida en células madre de cáncer ("cancer stem cell", CSC) (%) en esferoides tratados. Las barras representan el promedio de \geq 3 experimentos independientes \pm DE. (E) Tinción con ALDEFLUOR[™] de esferoides tratados para cuantificar la población de células madre de cáncer de mama que expresan la aldehído deshidrogenasa (un experimento representativo). (F) Análisis de qPCR que estudia el efecto del tratamiento sobre la expresión génica de la citoquina protumorigénica *IL6* y los genes relacionados con EMT *E-cadherina* y *PRRX1*. Las barras representan el promedio de \geq 2 experimentos independientes \pm DE.

Figura 14. Muestra el efecto de un tratamiento de quimioterapia-mAb de J1 sobre el crecimiento tridimensional de esferoides de MDA-MB-231 *in vitro*. Se trataron esferoides de cáncer de mama MDA-MB-231 con mAb (10 μ g/ml de J1-65D o mAb control mlgG1) en combinación con dosis subletales de los fármacos que se emplean habitualmente en el cáncer de mama (A) paclitaxel (Paclit.) y (B) doxorubicina (Dox.). Ambos tratamientos de combinación demostraron ser más eficaces en la reducción del crecimiento de los esferoides que cualquiera de los tratamientos por sí solo.

Figura 15. Demuestra que la sobreexpresión de J1 humana estimula el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*. (A) Se transdujeron células MDA-MB-231 y U87 con retrovirus que codifican J1 humana bicistóricamente con la proteína de fluorescencia verde ("green fluorescence protein", GFP). Las células transducidas con el vector o J1 se mezclaron y se cocultivaron con células parentales y se controló la población GFP⁺ mediante FACS de modo regular durante 35 días. En ambas líneas celulares, las células que expresan J1 muestran una ventaja de crecimiento frente a las células transducidas con el vector en un cocultivo mixto con la línea celular parental. (B) Células U87 transducidas solo con el vector o J1 se inyectaron en ratones BALB/c nu/nu (n = 7) y se midió el tamaño del tumor de modo regular para controlar el crecimiento tumoral. Las células U87 que expresan J1 humana muestran una ventaja de crecimiento significativa *in vivo*.

Figura 16. Demuestra que 10 mg/kg de mAb de J1 retrasa el sobrecrecimiento del tumor inducido por la sobreexpresión de J1, mientras que a 20 mg/kg abolen el sobrecrecimiento del tumor inducido por la sobreexpresión de J1. (A, B) Células U87 transducidas solo con el vector o J1 se inyectaron en ratones BALB/c nu/nu (experimento A, U87-Vec-PBS y U87-J1-183D, n = 7; U87-J1-PBS y U87-J1-65D, n = 6; experimento B, U87-Vec-PBS, n = 7; otros grupos: n = 10). Los animales se trataron mediante una administración intraperitoneal (i.p.) de J1-65D, o mAb de J1-183D a (A) 10 mg/kg, o (B) 20 mg/kg dos veces semanales comenzando al mismo tiempo que la inoculación del tumor. Se inyectaron grupos control con un volumen igual de PBS, o 20 mg/kg de un mAb de control IgG1. Se midió el tamaño del tumor de modo regular para controlar el crecimiento tumoral. Se generaron curvas de supervivencia basándose en el sacrificio del ratón cuando el tamaño de los tumores alcanzó un diámetro promedio geométrico ("geometric mean diameter", GMD) de 15 mm. *, P < 0,05 comparado con (A) el grupo de U87-J1-PBS, o (B) el grupo de U87-J1-IgG1.

Figura 17. Demuestra que los mAb de J1 retrasan los estadios tempranos del crecimiento tumoral de xenoinjertos de MDA-MB-231 *in vivo*. Se inocularon células MDA-MB-231 en ratones BALB/c nu/nu (A, B, n = 7; C, n = 10). Los animales se trataron mediante una administración intraperitoneal (i.p.) de J1-65D, o mAb de J1-183D a 10 mg/kg (A, B), o a 20 mg/kg (C) dos veces semanales comenzando al mismo tiempo que la inoculación del tumor. Se inyectaron grupos control con un volumen igual de PBS. Se midió el tamaño del tumor de modo regular para controlar el crecimiento tumoral. *, P < 0,05 comparado con el grupo de PBS. (B) Se confirmó la inhibición de la vía de Notch en el grupo de tratamiento de 10 mg/kg mediante un análisis con qPCR del ARN extraído de los tumores. Se observó una reducción en los genes diana de Notch humanos y murinos. Las barras representan el promedio de todos los tumores por grupo \pm EE.

Figura 18. Demuestra que los variantes de mAb de J1 recombinantes humanizados y desinmunizados se unen específicamente a la proteína J1 humana sobreexpresada en la superficie celular y no a la proteína J2. Se emplearon 16 variantes humanizados y desinmunizados (V1-16) de cada uno de los anticuerpos J1-65D (A) y J1-183D (B), y un variante quimérico de cada uno (Chi) para teñir células 293-JAG1 estables a las concentraciones indicadas, seguido de un anticuerpo secundario anti-APC humano. Las muestras se analizaron mediante FACS y se representan gráficamente las intensidades de fluorescencia promedio ("mean fluorescence intensities", MFI). También se incluyen la célula parental 293 y la célula control 293-JAG2 como controles. Se incluyó la tinción del mAb murino parenteral (J1-65D, J-183D) como control positivo y se detectó usando un anticuerpo secundario anti-APC de ratón. Con la excepción de los variantes de J1-65D 13-16, el resto de los anticuerpos se unen con eficacia a la proteína J1 humana.

Figura 19. Demuestra que los variantes de mAb de J1 recombinantes humanizados y desinmunizados conservan la especificidad por J1 humana y no se unen a J1 murina. Se emplearon los variantes de anticuerpos humanizados J1-65D (A) y J1-183D (B) y un variante quimérico de cada uno (Chi) para teñir células estables B16F10 que sobreexpresan mJAG1 a las concentraciones indicadas, seguido de un anticuerpo secundario anti-APC humano. Se empleó como control la célula parental B16F10 y células 293-JAG1 que expresan J1 humana. Las muestras se analizaron mediante FACS y se representan gráficamente las intensidades de fluorescencia promedio ("mean fluorescence intensities", MFI). Se detectó el mAb murino original (J1-65D, J1-183D) mediante un anticuerpo secundario anti-APC de ratón.

Figura 20. Inhibición de la señalización de Notch/Jagged 1 humana por mAb de J1 humanizados y desinmunizados *in vitro*. La línea de células de cáncer colorrectal LS174T que expresa luciferasa bajo el control del cofactor de Notch RbPJ fue estimulada con una proteína J1 recombinante expresada en células de mamífero (proteína NE3-Fc, barra derecha para cada tratamiento) o una proteína control (barra izquierda) en presencia de mAb de J1 (10 µg/ml), y se midió la actividad luciferasa. Se empleó el anticuerpo monoclonal murino parental (Mo), IgG murina, DMSO y DBZ como controles. Todos los variantes de anticuerpo J1-65D y J1-183D ensayados, incluyendo un anticuerpo quimérico (Chi), bloquean con eficacia la señalización de Notch inducida por J1.

Figura 21. Muestra los efectos de los anticuerpos J1-65D humanizados y desinmunizados sobre el crecimiento tridimensional de MDA-MB-231. Se cultivaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 como esferoides en presencia o en ausencia de J1-65D (mAb anti-Jagged 1) o a mlgG1 (mAb control). Todos los anticuerpos se usaron a 5 µg/ml, la concentración más baja que induce la máxima reducción en el crecimiento (véase la figura 11). Se incluyó el anticuerpo murino original (murino o de ratón) o DBZ como controles positivos, mientras que se usó DMSO y mlgG1 como controles negativos. (A) Curva de crecimiento de esferoides de células tumorales tratadas. (B) Tamaño de los esferoides en el día 9 de cultivo (5-6 esferoides por grupo). (C) Análisis estadístico que compara cada pareja de anticuerpos.

Figura 22. Muestra los efectos de los anticuerpos J1-183D humanizados y desinmunizados sobre el crecimiento tridimensional de MDA-MB-231. Se cultivaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 como esferoides en presencia o en ausencia de J1-183D (mAb anti-Jagged 1) o a mlgG1 (mAb control). Todos los anticuerpos se usaron a 5 µg/ml, la concentración más baja que induce la máxima reducción en el crecimiento (véase la figura 11). Se incluyó el anticuerpo murino original (murino o de ratón) o DBZ como controles positivos, mientras que se usó DMSO y mlgG1 como controles negativos. (A) Curva de crecimiento de esferoides de células tumorales tratadas. (B) Tamaño de los esferoides en el día 9 de cultivo (5-6 esferoides por grupo). (C) Análisis estadístico que compara cada pareja de anticuerpos.

Figura 23. Muestra las secuencias de aminoácidos del dominio CDR para el anticuerpo J1-183D de tipo salvaje, junto con las secuencias de CDR variantes usadas para construir una pluralidad de anticuerpos variantes. Las zonas sombreadas indican diferencias en la secuencia de aminoácidos con respecto al tipo salvaje. También se muestran las secuencias variantes y de tipo salvaje de V_L y V_H individuales completas que se usaron en la construcción de los anticuerpos variantes.

Figura 24. Muestra las secuencias de aminoácidos del dominio CDR para el anticuerpo J1-65D de tipo salvaje, junto con las secuencias de CDR variantes usadas para construir una pluralidad de anticuerpos variantes. Las zonas sombreadas indican diferencias en la secuencia de aminoácidos con respecto al tipo salvaje. También se muestran las secuencias variantes y de tipo salvaje de V_L y V_H individuales completas que se usaron en la construcción de los anticuerpos variantes.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al dominio de secuencia consenso Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) de Jagged 1 humana (también denominado Jag1 o J1) a través de nuevos epitopos, en el que dicho dominio DSL de Jagged 1 humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77. Dichos anticuerpos bloquean con eficacia las interacciones entre Jagged 1 humana-receptor Notch, inhiben la señalización mediada por Jagged 1 *in vitro* en líneas de células tumorales y el crecimiento tumoral dependiente de Jagged 1 humana *in vivo*, indicando así su idoneidad para su uso en la terapia del cáncer.

Cordle *et al.* (2008) determinaron que los restos 199-207 del dominio DSL de Jagged 1 humana desempeñan un papel crucial en la unión del receptor Notch [65]. Por tanto, los presentes inventores se sorprendieron de poder generar una serie de anticuerpos con las anteriores propiedades deseables, que reconocen epitopos que solo pueden definirse en común como que comprenden el resto E228 del dominio DSL.

5 Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención reconocen los epitopos que se han definido. Esta caracterización resulta deseable en el contexto de la terapia del cáncer, de forma notable en la terapia de combinación, en la que puede aparecer la resistencia a un fármaco o a un anticuerpo terapéutico como resultado de la mutación de uno o más restos en la proteína diana. Por tanto, resulta deseable tener en cuenta el sitio de unión de un anticuerpo terapéutico cuando se selecciona una o más terapias complementarias adecuadas para anticiparse y/o responder a la resistencia adquirida en las células malignas.

10 Los presentes inventores han generado anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio DSL de Jagged 1 humana mediante la inmunización de ratones con un fragmento extracelular limitado de Jagged 1 humana (restos 185-335 - DSL+EGF1-3). Después, las células de bazo extraídas de los ratones inmunizados se fusionaron con una línea celular de mieloma como compañero de fusión, se ensayaron para la reactividad con el antígeno y después se clonaron mediante dilución de células individuales para generar una línea celular de hibridoma que segrega una población homogénea de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes del cultivo de hibridoma que contienen los anticuerpos después se seleccionaron mediante ELISA y FACS para la unión al dominio DSL y el bloqueo de la interacción de Jagged 1-Notch 1, identificándose cuatro con las características deseadas (denominados J1-65D, J1-156A, J1-183D y J1-187B).

20 Los cuatro anticuerpos muestran una alta especificidad por la proteína diana, sin unión o con una unión mínima a los otros dos ligandos de Notch humanos que también contienen dominios DSL: Jagged 2 humana y ligando 4 similar a Delta humano (DLL4) (el alineamiento de las secuencias del dominio DSL puede encontrarse en Cordle *et al.*, 2008 [65]), según se demuestra mediante tinción inmunocitoquímica y análisis FACS (figuras 2 y 3). Por consiguiente, al producir un resultado negativo en uno o más ensayos de unión (cuando se compara con un control positivo, véase Ab de J2, figura 2, y hDLL4-GFP, figura 3), los anticuerpos de la presente invención pueden considerarse incapaces de reconocer específicamente cualquiera de los otros dos ligandos de Notch que contienen un dominio DSL. En consecuencia, no se observó actividad inhibitoria de los anticuerpos en la señalización mediada por Jagged 2 humana y DLL4 (figura 9B), lo cual indica la probabilidad de inhibición exclusiva de la señalización mediada por Jagged 1 en un contexto terapéutico. Además, no aparece una actividad de bloqueo *in vitro* por los presentes anticuerpos en la señalización mediada por Jagged 1 de ratón (figura 10) ni una interacción entre transfectantes de Jagged 1 de ratón y Notch 1 humano expresado de modo recombinante (figura 1). Se determinó la base molecular de las anteriores observaciones y esta consiste en la sustitución E228D entre Jagged 1 humana y de ratón (figura 7), con lo cual se demuestra que los anticuerpos de la presente invención reconocen específicamente epitopos que comprenden el resto E228 de Jagged 1 humana. Los variantes humanizados y desinmunizados de los anticuerpos J1-65D y J1-183D conservan estas características deseables (figuras 18 y 19).

35 Por contraste, con respecto a la señalización mediada por Jagged 1 humana, los anticuerpos de la presente invención (en forma de sobrenadantes de cultivos de hibridoma) muestran un eficaz bloqueo *in vitro* de la interacción entre células transfectadas con Jagged 1 y con Notch 1 marcado con fluorescencia y expresado de modo recombinante cuando se analizan con FACS (figura 1). Además, todos los anticuerpos (incluyendo los variantes humanizados y desinmunizados seleccionados) muestran una inhibición de la señalización de Notch mediada por Jagged 1 en diversas líneas celulares de tumores (figuras 9, 10B, 13, 17B y 20), además de la inhibición del crecimiento de esferoides tumorales (figuras 11, 12, 13, 14, 21 y 22) que puede ser potenciado por un tratamiento de combinación con fármacos para quimioterapia habituales (figura 14); también parece que la sobreexpresión de Jagged 1 tumoral es un factor crítico que potencia el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (figuras 15 y 16). De modo notable, los presentes anticuerpos son capaces de prevenir con eficacia el crecimiento tumoral dependiente de la sobreexpresión de Jagged 1 *in vivo*. Dada la identificación de CD46 como un nuevo receptor para Jagged 1 por Le Friec *et al.* (2012) [45] y la capacidad de los presentes anticuerpos para mostrar efectos inhibidores sobre la unión de Jagged 1-CD46 (figura 1B), esto también puede conferir un beneficio terapéutico potencial.

Otras propiedades de los anticuerpos descritos en la presente se describen en los ejemplos no limitantes.

50 El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina que reconoce específicamente un epitopo sobre una diana, según se determina por medio de las características de unión de los dominios variables de inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera (V_H y V_L), más específicamente, las regiones determinantes de la complementariedad ("complementarity determining regions", CDR). La expresión "anticuerpo monoclonal" y el término "anticuerpo" se emplean en la presente de modo intercambiable, a menos que se indique lo contrario. En la técnica se conocen muchas formas de anticuerpos potenciales que pueden incluir, pero no se limitan a una pluralidad de anticuerpos monoclonales intactos o mezclas policlonales que comprenden anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos F_{ab} , F_{ab} , $F_{(ab)}_2$ y F_v , anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos que comprenden fragmentos de anticuerpos), fragmentos variables monocatenarios (scF_v), anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y proteínas de fusión que comprenden los dominios necesarios para el reconocimiento de un epitopo concreto sobre una diana. Los anticuerpos también pueden conjugarse a diversos restos para obtener un efecto terapéutico, que incluyen, pero no

5 se limitan a fármacos citotóxicos y radionúclidos. Un anticuerpo puede comprender dominios constantes de cadena pesada de tipo γ , δ , α , μ y ϵ , en los que un anticuerpo que comprende dichos dominios se denomina de clase IgG, IgD, IgA, IgM o IgE, respectivamente. Las clases pueden dividirse en subclases según variaciones en la secuencia del dominio constante de cadena pesada (por ejemplo, IgG1-4). Las cadenas ligeras son de clase κ o λ , dependiendo de la identidad de la región constante.

10 La expresión "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, por sí solas o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones de marco ("framework regions", FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como "regiones hipervariables". Las CDR en cada cadena se mantienen juntas y muy cercanas entre sí por medio de las FR y, junto con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) una estrategia basada en la variabilidad de secuencia a través de las especies [79]; y (2) una estrategia basada en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo [78]. Además, en la técnica a veces se emplean combinaciones de estas dos estrategias para determinar las CDR.

15 La expresión "anticuerpos monoclonales" se refiere a una población homogénea de anticuerpos (que incluyen las formas previamente descritas, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos) que reconocen un único epitopo sobre una diana. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales, que generalmente incluyen una mezcla de anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes antigénicos diferentes. Además, un "anticuerpo monoclonal" se refiere a los anticuerpos generados por una serie de técnicas que incluyen, pero no se limitan a producción de hibridomas, selección con fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

20

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o sus fragmentos que contienen secuencias no humanas (por ejemplo, murinas) mínimas.

25 La expresión "anticuerpo desinmunizado" se refiere a anticuerpos que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o sus fragmentos que contienen secuencias mínimas que codifican epitopos potenciales de células T.

30 La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Generalmente, la región variable de ambas cadenas pesada y ligera se corresponde con la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas con las secuencias de anticuerpos derivados de otra especie (habitualmente un ser humano) para evitar suscitar una respuesta inmunológica en esa especie.

35 El término "epitopo" se refiere a una porción de una diana que es específicamente reconocida por un anticuerpo concreto. En los casos en que el antígeno es una proteína, el epitopo puede estar formado por una serie contigua o no contigua de aminoácidos (epitopos "lineales" o "de conformación", respectivamente), en los que, en el caso de los últimos, los restos que comprende el epitopo se juntan en el plegamiento tridimensional del polipéptido. Un epitopo generalmente comprende, pero no se limita a 3-10 aminoácidos en posiciones y orientaciones específicas entre sí. Las técnicas conocidas en la técnica para determinar el epitopo reconocido por un anticuerpo (de modo específico, para saber si un epitopo comprende o no un resto concreto) incluyen, pero no se limitan a mutagénesis dirigida específica de sitio o el uso de proteínas homólogas adecuadas con la proteína diana, en combinación con técnicas para determinar el reconocimiento específico o la falta de reconocimiento específico, tal como se ejemplifica a continuación. Como ejemplo y no como limitación, puede determinarse que un epitopo comprende un resto concreto mediante un análisis comparativo con un control que comprende el reconocimiento específico de la proteína diana nativa (no sustituida) por dicho anticuerpo, en donde una unión disminuida y/o la falta de reconocimiento específico por dicho anticuerpo, cuando se compara con dicho control, identifica un resto concreto como parte de un epitopo. Además, también pueden emplearse análisis estructurales de complejos de anticuerpo-proteína diana a través de la cristalografía de rayos X y/o la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), o sus derivados adecuados, para determinar los restos que constituyen un epitopo.

40

45

50 El término "porción" se refiere a cualquier estructura más pequeña que el total. Como ejemplo, el dominio DSL de Jagged 1 comprende 43 restos [65]. No sería posible que un anticuerpo reconozca específicamente un epitopo que comprenda el dominio DSL entero, puesto que las CDR de dicho anticuerpo deberían interactuar sustancialmente con cada resto. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden describirse como que reconocen específicamente una porción del dominio DSL de Jagged 1 humana. Los dominios DSL de J1 humana y de ratón se muestran como SEQ ID NO:77 y 78, respectivamente.

55 La expresión "reconoce específicamente", en el contexto de las interacciones anticuerpo-epitopo, se refiere a una interacción en la que el anticuerpo y el epitopo se asocian con más frecuencia o rapidez, o con mayor duración o afinidad, o con cualquier combinación de lo anterior, que cuando el anticuerpo o el epitopo se sustituye por una sustancia alternativa, por ejemplo, una proteína no relacionada. En general, pero no necesariamente, la referencia a un medio de unión significa el reconocimiento específico. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas

ortólogas en diferentes especies, un anticuerpo monoclonal puede reconocer específicamente un epitopo sobre una diana, tal como una proteína Jagged 1, en más de una especie (como ejemplo, los anticuerpos de la presente invención reconocen específicamente Jagged 1 humana, de conejo, de cobaya y de rata, figura 4). De modo similar, debido a la homología entre diferentes proteínas Jagged en ciertas regiones de las secuencias polipeptídicas de las proteínas, el reconocimiento específico por un anticuerpo monoclonal puede incluir la unión a un epitopo sobre más de una proteína Jagged (por ejemplo, Jagged 1 humana y Jagged 2 humana). Las técnicas conocidas en la técnica para determinar el reconocimiento específico de una diana por un anticuerpo monoclonal o su falta de reconocimiento incluyen, pero no se limitan a análisis FACS, tinción inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, transferencia Western/transferencia por puntos, ELISA, cromatografía de afinidad. Como ejemplo y no como limitación, puede determinarse el reconocimiento específico, o la falta de reconocimiento específico, mediante un análisis comparativo con un control que comprende el uso de un anticuerpo que se sabe, en la técnica, que reconoce específicamente dicha diana y/o un control que comprende la ausencia de reconocimiento específico o un mínimo reconocimiento específico de dicha diana (por ejemplo, en el que el control comprende el uso de un anticuerpo no específico). Dicho análisis comparativo puede ser cualitativo o cuantitativo.

Sin embargo, se entiende que un anticuerpo o resto de unión que muestra un reconocimiento específico exclusivo de una diana concreta tiene una mayor especificidad por dicha diana, cuando se compara con un anticuerpo que, por ejemplo, reconoce específicamente a la diana y a una proteína homóloga.

Los términos "receptor" y "ligando" tienen su significado convencional en la técnica.

El término "bloquear", en el contexto de las interacciones de receptor-ligando y su alteración por anticuerpos, se refiere a la capacidad de un anticuerpo para alterar la interacción nativa entre un receptor y un ligando, que probablemente implica el reconocimiento específico de un epitopo sobre el receptor o sobre el ligando. Las técnicas conocidas en la técnica para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear una interacción de receptor-ligando, o su falta de capacidad de bloqueo, incluyen, pero no se limitan a análisis FACS, ensayos basados en células que comprenden un gen indicador (por ejemplo, luciferasa) bajo el control de un efector corriente abajo de la señalización mediada por ligando, ensayos basados en células que comprenden el análisis de la transcripción y/o la traducción de un gen diana y/o una proteína de la señalización mediada por ligando, ensayos basados en células que comprenden el análisis del procesamiento proteolítico u otra modificación de al menos un componente corriente abajo de la señalización mediada por ligando. Como ejemplo y no como limitación, puede determinarse la capacidad de bloqueo, o la falta de capacidad de bloqueo, mediante un análisis comparativo con un control que comprende la inhibición sustancial de dicha interacción de receptor-ligando y/o un control que comprende la ausencia de inhibición o una inhibición mínima de dicha interacción de receptor-ligando. Dicho análisis comparativo puede ser cualitativo o cuantitativo. Dicho control que comprende la ausencia de inhibición o una inhibición mínima de dicha interacción de receptor-ligando puede comprender el tratamiento con un anticuerpo o proteína no específica.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se emplean en la presente de modo intercambiable y tienen su significado convencional en la técnica.

Los términos "aminoácido" y "resto" se emplean en la presente de modo intercambiable y tienen su significado convencional en la técnica. Los aminoácidos específicos se indican en la presente por medio de sus códigos convencionales de una y tres letras; además, los restos de Jagged 1 humana se numeran según Cordle *et al.* (2008) [65] y UniProt entrada P78504 (<http://www.uniprot.org>).

Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una sustitución en la que un resto aminoácido se reemplaza por otro resto aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos aminoácidos con cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales como ramificación en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservativa. Preferiblemente, las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la invención no abrogan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos con el antígeno o antígenos, es decir, dicha una o más proteínas Jagged a las cuales se une el polipéptido o anticuerpo. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son muy conocidos en la técnica.

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 iguales o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para lograr la máxima correspondencia, sin considerar las sustituciones de aminoácidos conservativas como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse usando algoritmos o programas de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En la técnica se conocen diversos algoritmos y programas que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos. Estos incluyen, pero no se limitan a BLAST y ALIGN. En algunas realizaciones, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la

invencción son sustancialmente idénticos, lo cual significa que presentan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de nucleótidos o restos aminoácidos cuando se comparan y se alinean para obtener la máxima correspondencia, y esto se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

5 En algunas realizaciones, la identidad existe a lo largo de una región de las secuencias que tiene una longitud de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40-60 restos. En algunas realizaciones, la identidad existe a lo largo de una región más larga que 60-80 restos, tal como al menos aproximadamente 90-100 restos. En algunas realizaciones, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando, tal como la región codificadora de una

10 secuencia de nucleótidos.

El término "polinucleótido" y la expresión "ácido nucleico" se emplean en la presente de modo intercambiable y tienen su significado convencional en la técnica.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el trastorno fisiológico en mamíferos en el que una población de células se caracteriza por presentar un crecimiento, una proliferación y/o una supervivencia anómalos.

15 Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, mieloma y leucemia.

Los términos "tumor" y "neoplasma" se refieren a cualquier masa de tejido que surge de un crecimiento, una proliferación y/o una supervivencia celular excesivo, tanto benigno (no canceroso) como maligno (canceroso), e incluyen lesiones precancerosas.

Las expresiones "célula cancerosa" y "célula tumoral" son equivalentes gramaticales que se refieren a la población total de células derivadas de un tumor o de una lesión precancerosa, e incluyen células no tumorigénicas, que comprenden la masa de la población celular del tumor, y células madre tumorigénicas (células madre del cáncer, "cancer stem cells", CSC). Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula tumoral" se modificará con la expresión "no tumorigénica" cuando se refiera solamente a las células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse, para distinguir estas células tumorales de las células madre del cáncer.

20

El término "tumorigénico" se refiere a las características funcionales de una célula madre de tumor sólido, que incluyen las propiedades de autorrenovación (que producen más células madre del cáncer tumorigénicas) y de proliferación para generar todas las demás células tumorales (que producen células tumorales diferenciadas y, por tanto, no tumorigénicas) que permiten a las células madre del tumor sólido formar un tumor. Estas propiedades de autorrenovación y de proliferación para generar todas las demás células tumorales confieren a las células madre del

25 cáncer la capacidad de formar tumores palpables tras el trasplante en serie en un hospedante inmunocomprometido (por ejemplo, un ratón), comparado con las células tumorales no tumorigénicas, que son incapaces de formar tumores tras un trasplante en serie. Se ha observado que las células tumorales no tumorigénicas pueden formar un tumor tras un trasplante primario en un hospedante inmunocomprometido después de obtener las células tumorales de un tumor sólido, pero estas células tumorales no tumorigénicas no producen un tumor tras un trasplante en serie.

30

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero) que incluye, pero no se limita a seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores y similares, que son los receptores de un tratamiento concreto. Generalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se emplean en la presente de modo intercambiable con referencia a un sujeto humano.

35

La expresión "excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente, vehículo o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con al menos un anticuerpo de la presente descripción, y que no destruye su actividad farmacológica y/o biológica y que no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del anticuerpo.

40

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en sujeto o para suscitar un efecto sobre una o más células *in vitro*. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir y/o detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluye, por ejemplo, la diseminación del cáncer en el tejido blando y el hueso; inhibir y/o detener la metástasis tumoral; inhibir y/o detener el crecimiento tumoral; aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; disminuir la tumorigenicidad, la frecuencia tumorigénica o la capacidad tumorigénica de un tumor; reducir el número o la frecuencia de células madre del cáncer en un tumor; diferenciar a las células tumorigénicas a un estado no tumorigénico; o una combinación de dichos efectos. En la medida en que el fármaco evita el crecimiento y/o mata a las células cancerosas preexistentes, el fármaco puede denominarse citostático y/o citotóxico. En el caso de un efecto sobre una o más células *in vitro*, una cantidad terapéuticamente

45 eficaz de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco puede inhibir el crecimiento de células tumorales cuando una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa Jagged 1 sobre la superficie celular, o células aisladas de la muestra de un paciente, tal como, por ejemplo, una biopsia de tejido, una efusión pleural, un aspirado de médula ósea o una muestra de sangre, se cultivan en un medio que contiene dicho anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco.

50

55

Los términos "tratar" y "tratamiento" y "aliviar" se refieran a 1) medidas terapéuticas que curan, frenan, disminuyen los síntomas y/o detienen el avance de una afección o trastorno patológico diagnosticado, y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o frenan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Así, aquellos que necesitan un tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno, los que son susceptibles a padecer el trastorno, y aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. En ciertas realizaciones, un sujeto se "trata" con éxito para el cáncer según los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número, o la ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; la inhibición o la ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluyen, por ejemplo, la diseminación del cáncer en el tejido blando y el hueso; la inhibición o la ausencia de metástasis tumoral; la inhibición o la ausencia de crecimiento tumoral; el alivio de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; una morbilidad y mortalidad reducidas; la mejora en la calidad de vida; la reducción en a tumorigenicidad, la frecuencia tumorigénica o la capacidad tumorigénica de un tumor; la reducción en el número o la frecuencia de células madre del cáncer en un tumor; la diferenciación de células tumorigénicas a un estado no tumorigénico; o una combinación de efectos.

La expresión "y/o", tal como se emplea en una frase tal como "A y/o B" en la presente pretende incluir cualquiera de las siguientes realizaciones: A y B; A o B; A (solo) y B (solo). De modo similar, la expresión "y/o", tal como se emplea en una frase tal como "A, B y/o C" pretende incluir cualquiera de las siguientes realizaciones: 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).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención se denomina J1-65D, que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención se denomina J1-156A, que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12. El anticuerpo, de forma poco habitual, también comprende una segunda cadena ligera (VL2), que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de CDR: CDR-L1, SEQ ID NO:79; CDR-L2, SEQ ID NO:80; y CDR-L3, SEQ ID NO:81. Los anticuerpos que poseen una única cadena pesada y dos cadenas ligeras se describen en [87].

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención se denomina J1-183D, que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención se denomina J1-187B, que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden presentar secuencias de CDR que se diferencian de las descritas en la presente por una sustitución, delección o inserción de aminoácidos. El anticuerpo resultante conservará las propiedades de reconocimiento específico de un epitopo que comprende el dominio DSL de Jagged 1 humana, que incluye el resto E228, y de bloqueo de la interacción entre Jagged 1 humana y sus receptores asociados.

En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos, comparado con una cualquiera de SEQ ID NO:1-6, preferiblemente las secuencias de aminoácidos no contienen más de 1, 2, 3 o 4 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos, comparado con una cualquiera de SEQ ID NO:7-12, que opcionalmente incluyen cualquier de SEQ ID NO:79-81, preferiblemente las secuencias de aminoácidos no contienen más de 1, 2, 3 o 4 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, delecciones o inserciones de

aminoácidos, comparado con una cualquiera de SEQ ID NO:13-18, preferiblemente las secuencias de aminoácidos no contienen más de 1, 2, 3 o 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

5 En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, comparado con una cualquiera de SEQ ID NO:19-24, preferiblemente las secuencias de aminoácidos no contienen más de 1, 2, 3 o 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención son sustancialmente idénticas cuando se comparan con SEQ ID NO:1-6.

10 En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención son sustancialmente idénticas cuando se comparan con SEQ ID NO:7-12, incluyendo opcionalmente SEQ ID NO:79-81.

En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención son sustancialmente idénticas cuando se comparan con SEQ ID NO:13-18.

15 En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las CDR de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana según la presente invención son sustancialmente idénticas cuando se comparan con SEQ ID NO:19-24.

20 Se muestran secuencias de CDR variantes específicas en la tabla 5, y los anticuerpos construidos con una o más de estas secuencias se encuentran dentro del alcance de la invención, con la excepción de los variantes que contienen J1-65D-V_L-4. Se muestran anticuerpos construidos con combinaciones de las secuencias de CDR variantes en la tabla 6, y estos se encuentran dentro del alcance de la invención, de nuevo con la excepción de J1-65D-V_L-4. Las secuencias de V_L y V_H de longitud completa se muestran en las figuras 23 y 24 (SEQ ID NO:57-76), que muestran variaciones fuera de las secuencias de CDR realizadas para la humanización y/o la desinmunización.

Todas las secuencias de CDR se han definido usando el sistema de numeración de Kabat [79].

25 Se sabe en la técnica que la inserción, la sustitución y/o la deleción de restos de CDR puede provocar un aumento o una disminución en la afinidad y/o la especificidad de un anticuerpo por una diana concreta. El efecto de dichas inserciones, sustituciones y/o deleciones depende de variables que incluyen la naturaleza del epítopo reconocido por el anticuerpo, la secuencia y la longitud de las CDR antes de la alteración y, en el caso de las sustituciones, las propiedades del nuevo aminoácido con relación al que ocupaba previamente la misma posición. Dichas alteraciones pueden ser realizadas por los expertos en la técnica para mejorar las propiedades de unión, tales como la afinidad y/o la especificidad, usando métodos conocidos en la técnica.

30 Los expertos en la técnica apreciarán que las propiedades de reconocimiento específico de un epítopo que comprende el dominio DSL de Jagged 1 humana, que incluye el resto E228, y de bloqueo de la interacción entre Jagged 1 humana y sus receptores asociados, que poseen los anticuerpos de la presente invención, pueden mantenerse sustancialmente o mejorarse mediante la sustitución de restos en 3 o menos, o en 2 o menos CDR en un dominio variable, en las que todos los restos, todos los restos excepto 1 de la CDR se sustituyen, y en las que
35 todas las sustituciones, todas las sustituciones excepto 1, todas las sustituciones excepto 2 son no conservativas.

40 Las CDR de longitud distinta a las de los anticuerpos de la presente invención también pueden conferir las propiedades de reconocimiento específico de un epítopo que comprende el dominio DSL de Jagged 1 humana, que incluye el resto E228, y de bloqueo de la interacción entre Jagged 1 humana y sus receptores asociados. Los expertos en la técnica también pueden realizar inserciones, sustituciones y/o deleciones de restos que forman las CDR con el fin de humanizar y/o desinmunizar un anticuerpo según la presente invención.

45 La presente proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos de unión a Jagged 1 humana descritos en la presente. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, cuyos ejemplos son conocidos en la técnica. Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse para inhibir el crecimiento tumoral y para tratar un cáncer en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano).

50 En ciertas realizaciones, las composiciones se preparan para su conservación y su uso combinando un anticuerpo de la presente invención purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un vehículo o un excipiente). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a tampones no tóxicos, tales como ampón fosfato, citrato y de otros ácidos orgánicos; sales, tal como cloruro de sodio; antioxidantes, que incluyen el ácido ascórbico y metionina; conservantes, tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menor que aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona;
55 aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos, tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales

como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos, tales como complejos de Zn-proteína; y tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de cualquier forma convencional. La administración puede realizarse mediante administración parenteral, más en concreto mediante administración intravenosa. Sin embargo, también se contemplan otras vías de administración.

10 En ciertas realizaciones, además de comprender un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden además al menos un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, dicho al menos un agente terapéutico adicional comprende 1, 2, 3 o más agentes terapéuticos adicionales.

15 En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional puede administrarse antes, al mismo tiempo y/o después de la administración del anticuerpo de unión a Jagged 1 humana durante una terapia (terapia de combinación). En algunas realizaciones, dicho al menos un agente terapéutico adicional comprende 1, 2, 3 o más agentes terapéuticos adicionales. La terapia de combinación con al menos dos agentes terapéuticos a menudo implica a agentes que actúan mediante distintos mecanismos de acción, aunque esto no es necesario. La terapia de combinación que emplea agentes con diferentes mecanismos de acción puede provocar efectos aditivos o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir usar una dosis más baja de cada agente que la que se emplea en la monoterapia, reduciendo con ello los efectos secundarios tóxicos. La terapia de combinación puede disminuir la probabilidad de que se desarrollen células del cáncer resistentes. La terapia de combinación puede permitir que un agente terapéutico se dirija a las células madre del cáncer tumorigénicas, mientras que un segundo agente terapéutico puede dirigirse a células del cáncer no tumorigénicas.

25 Se apreciará que la combinación del anticuerpo de unión a Jagged 1 humana y un agente terapéutico adicional puede administrarse en cualquier orden o al mismo tiempo. En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana se administrará a pacientes que previamente se han sometido a un tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana y un segundo agente terapéutico se administrarán sustancialmente de modo simultáneo o al mismo tiempo. Por ejemplo, un sujeto puede recibir el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana (por ejemplo, un anticuerpo) mientras se está sometiendo a un tratamiento con un segundo agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia). En ciertas realizaciones, el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana se administrará dentro de 1 año del tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas realizaciones alternativas, el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana se administrará dentro de 10, 8, 6, 4 o 2 meses de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana se administrará dentro de 4, 3, 2 o 1 semanas de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana se administrará dentro de 5, 4, 3, 2 o 1 días de cualquier tratamiento con un segundo agente terapéutico. Se apreciará también de los dos (o más) agentes o tratamientos pueden administrarse al sujeto dentro de unas horas o minutos (es decir, sustancialmente de modo simultáneo).

40 Las clases útiles de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, ligantes del surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino, tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinuclear y carboplatino), antraciclina, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizantes a la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizantes a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, vinca-alcaloides, o similares. En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antimetabolito, un antimetabólico, un inhibidor de topoisomerasa, o un inhibidor de la angiogénesis.

45 Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana incluyen agentes quimioterapéuticos. Así, en algunas realizaciones, el método o el tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana o anticuerpo de la presente invención, y un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un anticuerpo puede realizarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de las quimioterapias. La administración combinada puede incluir la coadministración, en una única formulación farmacéutica o usando diferentes formulaciones, o la administración consecutiva en cualquier orden, pero en general dentro de un periodo de tiempo, de modo que todos los agentes activos pueden ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.

55 Los agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención incluyen, pero no limitan a agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno, tales como cloranbucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, muestra de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas,

5 cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido microfenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; 10 antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citosina arabinósido, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglucetimidina, mitotano, 15 trilostano; reponedores del ácido fólico, tales como ácido folínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguzona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; 20 dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL) y docetaxel (TAXOTERE); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; 25 Xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos, que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos que interfieren con la acción de una enzima topoisomerasa (por ejemplo, topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a doxorubicina HCl, citrato de daunorubicina, mitoxantrona HCl, actinomicina D, etopósido, topotecano HCl, tenipósido (VM-26) e irinotecano, así como las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. 30 En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es irinotecano.

En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito. Un antimetabolito es un producto químico con una estructura que es similar a un metabolito necesario para las reacciones bioquímicas normales, pero lo suficientemente diferente para interferir con una o más funciones normales de las células, tales como la división 35 celular. Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato sodio, raltrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinósido, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina y cladribina, así como las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico es gemcitabina.

40 En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente antimetabólico que incluye, pero no se limita a agentes que se unen a la tubulina. En algunas realizaciones, el agente es un taxano. En ciertas realizaciones, el agente es paclitaxel o docetaxel, o un sal farmacéuticamente aceptable, ácido o derivado del paclitaxel o docetaxel. En ciertas realizaciones, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel unido a albúmina (ABRAXANE), DHA-paclitaxel, o PG-paclitaxel. En ciertas realizaciones alternativas, el agente antimetabólico 45 comprende un vinca-alcaloide, tal como vincristina, binblastina, vinorelbina o vindesina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados. En algunas realizaciones, el agente antimetabólico es un inhibidor de quinesina Eg5 o un inhibidor de una quinasa mitótica, tal como Aurora A o Plk1. En ciertas realizaciones en las que el agente quimioterapéutico administrado en combinación con el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana es un agente antimetabólico, el cáncer o el tumor que se está tratando es un cáncer de mama o un tumor de mama.

50 En ciertas realizaciones, la terapia de combinación implica la administración combinada de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana de la presente invención y terapia de radiación. El tratamiento con el anticuerpo de unión a Jagged 1 humana puede realizarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de la terapia de radiación por un médico experto.

En algunas realizaciones, un segundo agente terapéutico comprende un anticuerpo. Así, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana de la presente invención con 55 otros anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2, HER2, DLL4, Notch y/o VEGF. En ciertas realizaciones, un segundo agente terapéutico es un anticuerpo que es un inhibidor de la angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF). En ciertas realizaciones, un segundo agente terapéutico es bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), panitumumab (VECTIBIX), o cetuximab (ERBITUX). La administración combinada puede incluir la coadministración, en una única formulación farmacéutica o usando diferentes formulaciones, o la administración consecutiva en cualquier orden, pero en general 60

dentro de un periodo de tiempo de modo que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente.

Además, la terapia de combinación con los anticuerpos de unión a Jagged 1 humana descritos en la presente puede incluir el tratamiento con una o más citoquina (por ejemplo, linfoquinas, interleuquinas, factores de necrosis tumorales y/o factores de crecimiento).

Además, el tratamiento con los anticuerpos de unión a Jagged humana descritos en la presente puede realizarse mediante la retirada quirúrgica de los tumores, células cancerosas o cualquier otra terapia que el médico encargado considere necesaria.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en el tratamiento de tumores/cánceres. Dichos tumores/cánceres incluyen, pero no se limitan a los que comprenden la expresión de Jagged 1 tumoral y/o la señalización mediada por Jagged 1, preferiblemente cuando dicha expresión y/o señalización está asociada con efectos patológicos. Los tumores/cánceres que comprenden la expresión de Jagged 1 tumoral y/o la señalización mediada por Jagged 1 incluyen, pero no se limitan a: cáncer pancreático, leucemia linfocítica crónica de células B, carcinoma de células escamosas de la lengua, glioma, cáncer renal, leucemia aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer gástrico, ameloblastoma, adenocarcinoma esofágico de Barrett, cáncer de pulmón, meduloblastoma, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma difuso de células B grandes, trastornos linfoproliferativos de CD30⁺ cutáneos primarios, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma hepatocelular, tumores/cánceres que comprenden células madre del cáncer.

Los tumores/cánceres que van a ser tratados mediante los anticuerpos de la presente invención también incluyen, pero no se limitan a los que comprenden uno o más procesos microambientales del tumor en los que se ha implicado a la señalización mediada por Jagged 1 y/o Notch, preferiblemente cuando dichos procesos están asociados con efectos patológicos. Los procesos microambientales del tumor en los que se ha implicado a la señalización mediada por Jagged 1 y/o Notch aparecen en múltiples tipos de cánceres e incluyen, pero no se limitan a: maduración vascular, angiogénesis, inmunosupresión mediada por células T, células dendríticas foliculares, modulación inmunológica por células T reguladoras, transición epitelial a mesenquimática, señalización de CD46.

Los tumores/cánceres que van a ser tratados mediante los anticuerpos de la presente invención también incluyen, pero no se limitan a los que comprenden la señalización mediada por Jagged 1 entre células del tumor/cáncer y células que comprenden el microentorno del tumor.

Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en forma recombinante. Las células hospedantes adecuadas para la expresión de un anticuerpo de unión a Jagged 1 humana recombinante incluyen procariotas, levaduras, células de insecto o de eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células de eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen de mamífero, tal como se describe a continuación. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células.

Se utilizan diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar proteínas recombinantes. Puede preferirse la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero, porque dichas proteínas en general están correctamente plegadas, están modificadas de forma apropiada y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas de células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen las líneas celulares COS-7 (derivadas de riñón de mono), L-929 (derivadas de fibroblastos murinos), C127 (derivadas de tumor mamario murino), 3T3 (derivadas de fibroblastos murinos), CHO (derivadas de ovario de hámster chino), HeLa (derivadas de cáncer cervical humano) y BHK (derivadas de fibroblastos de riñón de hámster). Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de la replicación, un promotor y un potenciador adecuados unidos al gen que se va a expresar, y otras secuencias no transcritas en los flancos 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, y secuencias de fin de la transcripción.

Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto son conocidos por los expertos en la técnica.

Un anticuerpo de la invención también puede administrarse a un paciente a través de técnicas de terapia génica, por las cuales al paciente se le administra un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Por ejemplo, puede administrarse un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, de modo que el anticuerpo se expresa *in vivo*. La administración de un anticuerpo mediante dichas técnicas adecuadas será evidente para los expertos en la técnica [88], [89].

Un anticuerpo de la invención también puede administrarse junto con un virus oncolítico en el tratamiento del cáncer. Esto puede mejorar el efecto letal de espectador ("bystander") de dicha terapia.

Los anticuerpos de la invención no se unen de forma adecuada a Jagged 1 de ratón, pero sí se unen a Jagged 1 de rata. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para bloquear la señalización paracrina entre

la Jagged 1 derivada de células de rata endógena y una línea celular humana dentro de un xenoinjerto. Esto puede ser útil para ensayar los anticuerpos para determinar si son tóxicos y/o tienen una mayor eficacia. Por consiguiente, la presente invención proporciona un ensayo para ensayar endógenamente la toxicidad y/o la eficacia de un anticuerpo anti-Jagged 1, que comprende administrar el anticuerpo de ensayo a una rata que comprende un xenoinjerto con una línea de células de cáncer humano, y determinar el efecto de toxicidad o determinar el nivel de inhibición de la señalización de Notch, en el que el anticuerpo es como se define en la reivindicación 1.

La invención se describe más a fondo a continuación en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales anti-J1

Para generar mAb específicos de J1 humana con el potencial de bloquear la unión de J1 a los receptores Notch, se generaron tres antígenos J1 humanos de diferente longitud. Estos comprenden las proteínas recombinantes del dominio DSL y DSL-EGF3 (DSL + EGF1-3) expresadas y plegadas, un péptido 18-mero derivado del dominio DSL que se corresponde con la región que se ha indicado que media en el contacto directo con la proteína Notch [65]. Estos se emplearon como inmunógenos para inmunizar ratones MF1. Se generaron líneas celulares de hibridoma a través de una técnica de fusión convencional usando las células del bazo de los animales inmunizados y una línea celular de compañero de fusión de mieloma murino NS0. La selección mediante ELISA contra los inmunógenos identificó 99 anticuerpos reactivos. La inmunotinción y FACS contra células transfectadas con J1 identificó solo 21 hibridomas que son capaces de reconocer la J1 de la superficie celular (tabla 1).

Tabla 1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-J1

Inmunógeno	Fusión	Positivo a ELISA	Positivo a FACS
DSL-EGF3	4	74	20
DSL	2	9	1
Péptido de DSL	2	16	0

Ejemplo 2: Especificidad de unión y bloqueo de mAb de J1

Para identificar funcionalmente mAb con la capacidad de alterar la interacción de proteína:proteína J1-N1, se ensayaron sobrenadantes de cultivos de hibridoma en un ensayo de unión basado en FACS. Se unió la proteína recombinante N1 EGF11-13 humana soluble biotinilada a esferas revestidas de avidina y se usó para teñir células que expresan J1 en presencia o en ausencia de cada mAb que reconoce la hJ1 de la superficie celular mediante FACS. Cinco (J1-65D, -156A, -183D, -187B y -142B, este último no es un anticuerpo según la presente invención) de los 21 mAb fueron capaces de bloquear la unión de N1 a J1 con diferentes eficacias: J1-65D, -183D y -156A bloquearon completamente la unión, mientras que J1-187B y -142B bloquearon parcialmente la unión (figura 1A). Los cuatro anticuerpos de bloqueo de la invención también fueron capaces de bloquear la unión de CD46 recombinante a una proteína recombinante J1 DSL-EGF3 marcada con biotina en un ensayo ELISA (figura 1B). Así, se demuestra su capacidad para bloquear la unión de J1 a múltiples receptores. Los cuatro mAb de bloqueo de la invención se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo sin suero y se usaron concentraciones iguales de anticuerpos purificados para comparar su actividad en posteriores ensayos (a menos que se especifique un sobrenadante de hibridoma). La conservación de la secuencia a través del dominio DSL hace surgir la posibilidad de que los mAb de J1 también sean capaces de unirse a la proteína Jagged 2 (J2). La especificidad de unión del anticuerpo se ensayó inicialmente mediante un marcaje inmunocitoquímico de muestras de citocentrifugadas de transfectantes de hJ1 y hJ2 (figura 2). Todos los anticuerpos tiñeron los transfectantes de J1, pero ninguno tiñó las células transfectadas con J2, y se confirmó la expresión de J2 en el mismo experimento usando un anticuerpo anti-J2 comercial. Se investigó más a fondo la especificidad de los mAb purificados en células de mamífero transfectadas con hJ2, el ligando 4 similar a Delta humano (hDLL4), o mJ1 (figura 3). Los transfectantes se tiñeron en FACS con 10 µg/ml de cada uno de los cuatro mAb de bloqueo. Tal como se había observado previamente, todos los mAb tiñeron los transfectantes de hJ1. Solo se observó una unión débil de los mAb J1-65D y J1-183D a mJ1, lo cual es coherente con que estos reactivos son incapaces de bloquear funcionalmente la unión de mJ1 a N1 (figura 1). Ninguno de los mAb mostró una unión significativa a hDLL4, mientras que se observó una unión muy débil a J2 con J1-156A y J1-187B (figura 3).

Para ensayar las eficacias de bloqueo de los mAb de J1, los mAb purificados se titularon para determinar la concentración requerida para bloquear la unión de N1 recombinante a hJ1 expresado sobre la superficie celular. Se usaron esferas revestidas con proteína N1 EGF11-13 expresada en bacterias para teñir las células que expresan hJ1 en presencia de diversas concentraciones de mAb. Tal como se muestra en la tabla 2, todos los mAb fueron capaces de bloquear la unión de N1 a J1 a una concentración menor que la concentración terapéuticamente pertinente de 10 µg/ml. J1-65D y J1 -183D mostraron el efecto inhibitor más potente, y fueron capaces de inhibir completamente la unión de N1 a 1 µg/ml.

Tabla 2. Titulación de mAb de J1 para bloquear la interacción de J1-N1

	0,2 µg/ml	1,0 µg/ml	2,0 µg/ml	5,0 µg/ml
J1-65D	X	+++		
J1-183D	X	+++		
J1-156A	X	+	+++	
J1-187B	X	X	+	+++

+++ Bloqueo completo
+ Bloqueo parcial
X Sin efecto

- 5 Para cuantificar la afinidad de unión de estos mAb por la proteína J1, se realizó una resonancia de plasmón de superficie ("Surface Plasmon Resonance", SPR) para investigar la unión de los mAb de J1 con tres formas diferentes de proteína soluble J1: el inmunógeno expresado en bacterias DSL-EGF3 (J1-DE3), y dos formas más largas expresadas en eucariotas que incluyen el N-terminal entero hasta el tercer dominio EGF (J1-NE3) o el N-terminal entero hasta EGF12 (J1-NE12). Se midió la K_D de cada unión como se muestra en la tabla 3. En coherencia con los
- 10 datos de los experimentos de unión y bloqueo descritos anteriormente, J1-183D y J1-65D mostraron la mayor afinidad de unión a las tres formas de proteínas J1.

Tabla 3. Constantes de disociación (Kd) de mAb de J1 a proteínas hJ1

	J1-DE3	J1-NE3	J1-NE12
J1-65D	9,7 nM	3,3 nM	3,0 nM
J1-156A	15,0 nM	48,0 nM	36,0 nM
J1-183D	4,9 nM	5,2 nM	4,4 nM
J1-187B	75,0 nM	94,0 nM	70,0 nM

- 15 La falta de actividad de bloqueo frente a J1 murina (figura 1) se explica potencialmente por las diferencias en la secuencia del dominio DSL entre las proteínas J1 humana y murina. El alineamiento de las secuencias de la proteína J1 correspondientes al dominio DSL y las repeticiones EGF de una gama de especies demuestra la conservación completa en primates, mientras que las secuencias del dominio DSL fueron idénticas a la humana en varias especies, que incluyen roedores, tales como conejos y cobayas. Para investigar más a fondo la reactividad entre especies, se marcaron los epitopos del dominio DSL y tres dominios EGF de J1 humana, murina, de conejo,
- 20 de cobaya, de cerdo y de rata y se expresaron sobre la superficie celular y después se ensayaron para su capacidad para unirse a los mAb de J1 (figura 4). Los cuatro anticuerpos se unen con eficacia a la J1 de conejo, cobaya y rata. Los cuatro anticuerpos se unen a mJ1 con menos eficacia que la proteína humana, y no se observó unión con J1-156A. Se confirmó la unión de anticuerpos a células adherentes primarias aisladas a partir de bazo de rata con J1-65D y J1-183D, lo cual indica la unión de la proteína J1 nativa en esta especie (figura 4).

- 25 Ejemplo 3: Reconocimiento de J1 expresada por líneas de células de cáncer humanas

- La mayoría de los experimentos previos se realizaron usando J1 expresada de modo recombinante. Se ensayó la capacidad de los mAb de J1 para unirse a J1 expresada endógenamente mediante tinción con FACS de líneas de células de cáncer derivadas de diferentes tipos de tejidos, que incluyen cáncer de mama, leucemia, linfoma, mieloma y cáncer colorrectal (tabla 4 y figura 12A). Los cuatro mAb de J1 en general se comportan de modo similar,
- 30 aunque J1-65D y J1-183D tiñeron un panel de líneas celulares ligeramente más amplio. Esto resulta coherente con su mayor afinidad por J1. Los perfiles de tinción demuestran que la expresión de J1 sobre la superficie celular es muy coherente con los resultados de publicaciones previas que detectan la expresión de J1 con otras técnicas, tales como RT-PCR y transferencia Western [58, 59].

- 35 De manera interesante, múltiples líneas celulares derivadas del linfoma difuso de células B grandes ("diffuse large B-cell lymphoma", DLBCL), que incluyen DB, Karpas 422, OCI-Ly3, RIVA, SUDHL-10 y U-2932, resultaron marcadas usando los mAb de J1. El DLBCL comprende 30-40% de linfomas no hodgkinianos adultos en los países occidentales, y es heterogéneo desde el punto de vista morfológico y clínico. Los pacientes se tratan habitualmente con quimioterapia de CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab (R-CHOP). Se han seguido muchas estrategias diferentes para la estratificación del riesgo en este
- 40 grupo de pacientes; los ejemplos incluyen el índice de pronóstico internacional, la célula de origen [DLBCL similar a células B activadas (ABC) de prognosis mala o DLBCL similar a células B de centro germinal (GCB)] y firmas

estromáticas en el microentorno (analizado en [60]). De manera interesante, una firma estromática 2 de prognosis mala implica la angiogénesis y la densidad de vasos sanguíneos como predicción de un resultado clínico adverso [61]. También se ha indicado la densidad de microvasos ("microvessel density", MVD) como un factor de pronóstico adverso en DLBCL [62].

- 5 Se han puesto en práctica ensayos clínicos que combinan R-CHOP con bevacizumab (anti-VEGF) en pacientes con DLBCL como una estrategia para dirigirse a la angiogénesis, pero no han resultado ser prometedores en términos de un mejor resultado y han provocado un aumento en las toxicidades graves [63], a pesar de que el bevacizumab presenta cierta actividad prometedora como agente único [64]. Una evaluación desfavorable del riesgo-beneficio condujo a Roche a aceptar la recomendación de un comité de control de datos y seguridad independiente para detener el reclutamiento en su ensayo MAIN del bevacizumab + R-CHOP en DLBCL el 3 de junio de 2010. Se ha indicado una ganancia de número de copias de Notch2 y una ganancia de mutaciones de función en DLBCL [18], pero no parecen existir informes que impliquen a J1 en la patogénesis de esta malignidad. Así, esta es una malignidad que expresa Jagged 1 para la cual existe una necesidad clínica no satisfecha de otros fármacos que se dirijan a la angiogénesis.
- 10
- 15 Tabla 4. Tinción de líneas de células de cáncer humano y células normales por los mAb de J1

		J1-65D	J1-156A	J1-183D	J1-187B
T-ALL	CEM	-	-	-	-
	Jurkat	+	+	+	+
	MOLT-4	-	-	-	-
Mieloma	H929	+	+	+	+
	JJN3	+	+	+	+
	RPMI8226	+	+	+	+
	Thiel	+	+	+	+
Cáncer de mama	MDA-MB-231	+	+	+	+
	MDA-MB-453	+	+	+	+
	MDA-MB-468	+	-	+	-
	T47D	-	-	+	-
	BT20	+	-	-	-
	BT459	+	-	+	-
	HCC1143	+	-	+	-
	HCC1806	+	-	+	-
	CAL-51	+	-	+	-
	MCF7	+/-	-	+/-	-
B-NHL	DB	+	-	+	+
	FL-18	-	-	-	-
	Granta 519	+	-	+	-
	Karpas 422	+	+	+	+
	Mieu	-	-	-	-
	OCI-Ly1	-	-	-	-
	OCI-Ly3	+	+	+	+
	OCI-Ly8	-	-	-	-

	RIVA	+	+	+	+
	SU-DHL10	+	+	+	+
	SU-DHL4	-	-	-	-
	SU-DHL6	-	-	-	-
	SU-DHL9	-	-	-	-
	U-2932	+	+	+	+
HL	KM-H2	-	-	-	-
Cáncer colorrectal	LS174T	+		+	
	HCT116	+	+	+	+
	DLD-1	+	+	+	+
	HT-29	+	+	+	+
Cáncer de próstata	DU145	-			
	PC3	+	+	+	+
Cáncer de ovario	OVCAR-3	+	+	+	+
Cáncer de hígado	HepG2	+	+	+	+
Cáncer de pulmón	H1993	+	+	+	+
	H1435	+	+	+	+
	H460	+	+	+	+
Células endoteliales primarias	HUVEC	+	+	+	+

5 Para validar más a fondo la especificidad de los mAb de J1 para detectar J1 endógena, se realizó una inactivación de genes en una línea de células de cáncer de mama MDA-MB-231 usando ARNhc de *J1* de lentivirus (figura 5). Tal como se muestra mediante la tinción FACS, el silenciamiento de *J1* abroga completamente la unión con los dos mAb ensayados, confirmando así su especificidad por *J1*.

Ejemplo 4: Cartografiado de epitopos

10 Se ha identificado una cara conservada del dominio DSL como crítica para la unión al receptor Notch [65]. De los 21 mAb anti-J1 que reconocen a *J1* sobre la superficie celular mediante FACS, 13 reconocen epitopos contenidos dentro del dominio DSL mediante ELISA (figura 6A). Es probable que el resto de los anticuerpos presenten epitopos dentro de los dominios EGF, epitopos que abarcan los límites del dominio DSL-EGF o los que son sensibles a la conformación y requieren un dominio flanqueante.

Como solo cuatro de los 13 anticuerpos de transporte dirigido anti-dominio DSL muestran actividad de bloqueo, los datos de los inventores claramente demuestran que la generación de anticuerpos capaces de unirse al dominio DSL de *J1* no es suficiente, en sí misma, para conferir su capacidad de alterar la unión del receptor-ligando.

15 Los aminoácidos clave en *J1* (F199, R201, R203, D205, F207) están expuestos sobre una cara del dominio DSL y forman un sitio de unión a Notch putativo [65]. Las proteínas *J1* mutantes con sustituciones de alanina en los restos clave predichos entonces se ensayaron para su capacidad para evitar la unión del mAb de *J1* mediante transferencia por puntos. Ninguno de los mutantes evitó la unión del mAb J1-183D, pero las sustituciones de F199, R201, R203 y F207 inhibieron la unión de los otros tres mAb (figura 6B, panel izquierdo). Estos resultados sugieren que aunque
20 todos los mAb son capaces de bloquear la unión del receptor-ligando, cada uno puede ponerse en contacto con la proteína *J1* en restos aminoácidos diferenciados.

Algunos de los mAb no bloqueantes también se ensayaron para su unión a estos restos clave (figura 6B, panel derecho). La mayoría de estos mAb no interaccionan con los aminoácidos clave, puesto que su unión a la proteína no se vio afectada por las sustituciones en el dominio DSL (J1-49B, J1-62C, J1-116B, J1-180B y J1-121D). Esto
25 sugiere que estos mAb no bloqueantes se unen a *J1* fuera del sitio de unión a Notch putativo. Pero la unión de los

otros 4 mAb, J1-191H, J1-187C, J1-77B y J1-13C, se vio claramente afectada por estas sustituciones de restos clave, lo cual sugiere que estos restos, por sí solos, no son suficientes para bloquear la interacción con Notch. Algunos anticuerpos (J1-62C, J1-191H, J1-187C, J1-121D, J1-77B y J1-13C) requieren unas concentraciones considerablemente mayores de proteína J1 recombinante para poder ser detectados mediante la transferencia por puntos, así, una posibilidad probable es que la afinidad de estos mAb por la proteína J1 es demasiado baja para permitir el bloqueo funcional de su unión a N1.

Los cuatro mAb bloqueantes de J1 con epitopos dentro del dominio DSL muestran una especificidad de especie funcional, ya que pueden bloquear la unión de J1 humana, pero no de J1 murina, a N1. El alineamiento de secuencias muestra que existen solo dos diferencias de aminoácidos entre la J1 humana y de ratón en sus dominios DSL, en las posiciones 190 y 228 (figura 7A). Un aminoácido adyacente en la primera repetición de EGF (posición 231) también es diferente. Estas otras mutaciones puntuales se emplearon para determinar si los efectos de bloqueo específicos de humanos de los mAb están o no mediados por la unión del anticuerpo a estos restos clave. Se evitó la unión de los cuatro anticuerpos de J1 dirigidos al dominio DSL cuando el resto ácido glutámico humano en el aminoácido 228 se mutó al resto ácido aspártico murino (E228D). La mutación de Y190 en el dominio DSL o de R231 en EGF1 no bloquea la unión, lo cual indica que la especificidad por J1 humana es conferida principalmente por la unión de E228 (figura 7B). Por tanto, los cuatro anticuerpos dirigidos al dominio DSL de J1 descritos en la presente se unen a un nuevo epitopo/interfase sobre DSL de la proteína J1 humana (que incluye el aminoácido E228), que no se encuentra conservado en la proteína J1 murina y que también está ausente en la proteína J2 humana. La sustitución E228D no evita la unión del mAb J1-142B (que no es un anticuerpo según la presente invención), que reconoce las proteínas J1 humana y murina.

Cuando cada uno de los mAb se ensaya para su capacidad para bloquear la unión de los otros mAb a J1, todos muestran cierta capacidad para bloquear la unión de sí mismos y de los demás mAb (figura 8). Los epitopos del dominio DSL parecen estar todos lo suficientemente cerca para evitar que dos mAb diferentes se unan con eficacia a J1 al mismo tiempo. Así, aunque se ponen en contacto con distintos aminoácidos individuales, todos se unen dentro de una interfase similar sobre el dominio DSL de J1. Los resultados sugieren que no es probable que se obtenga una ganancia inicial cuando se emplean estos anticuerpos juntos en combinación. Sin embargo, puesto que J1-65D y J1-183D muestran ambos una buena actividad funcional y reconocen aminoácidos diferenciados dentro del dominio DSL, entonces podría tener algún valor utilizar un segundo anticuerpo dentro del contexto de la resistencia adquirida al primer reactivo, si la actividad de unión del segundo anticuerpo sigue siendo eficaz.

Ejemplo 5: Ensayo funcional del bloqueo por mAb de la señalización de Notch endógena

Tras establecer que los mAb de J1 son capaces de bloquear la unión del ligando J1 a su receptor N1, se investigó su efecto sobre la actividad de la vía de señalización de Notch. La línea de células de cáncer colorrectal LS174T, que expresa de modo estable un gen indicador de luciferasa bajo el control del cofactor de Notch RBPJ, se estimuló con dos formas de la proteína J1 inmovilizada: N-terminal a EGF3 y N-terminal a EGF12. Se descubrió que ambas proteínas activan la actividad del gen indicador de luciferasa con eficacia, y esta inducción fue bloqueada por el inhibidor de γ -secretasa DBZ, un inhibidor de pan-Notch que también inhibe la señalización de Notch basal (figura 9A). Cuando se añaden los mAb de J1 al sistema de cultivo, la actividad luciferasa fue significativamente inhibida, mostrando J1-65D y J1-183D la inhibición más potente. De manera importante, los dos mejores mAb de J1 (J1-65D y J1-183D) también se ensayaron contra otros ligando de Notch para verificar la especificidad de ligando. Tal como se muestra en la figura 9B, ninguno de estos mAb fue capaces de evitar la activación de Notch inducida por otros ligandos ensayados (J2 y DLL4).

También se investigó la capacidad de los mAb de J1 para bloquear la activación de Notch de un gen diana endógeno, *HES1* (figura 9C). Se trataron células MDA-MB-231, que expresan niveles significativos de N1 y J1, con los mAb de J1 y se investigaron los niveles de actividad del gen diana de Notch. De forma similar al ensayo de luciferasa, todos los mAb de J1 mostraron una capacidad significativa para reducir la expresión de un gen diana regulado por Notch. J1-65D y J1-183D fueron los más eficaces en reprimir la transcripción de *HES1*. Para ensayar si cualquiera de los mAb de J1 podría modular la expresión de la diana de Notch *Hes1* en células murinas, se cultivaron células B16F10 de melanoma murino que sobreexpresan mJ1 en presencia de cada mAb de J1, mAb J1-142B (como control positivo que se une a la proteína mJ1), un mAb de IgG1 de control negativo o el inhibidor de pan-Notch DBZ (figura 10A). Se observó la represión de la expresión de *Hes1* usando DBZ y, en un grado menor, el anticuerpo J1-142B. No se observó represión para los otros anticuerpos anti-J1 o el anticuerpo IgG1 control. La incapacidad de los anticuerpos J1-65D, J1-156A, J1-183D y J1-187B para bloquear la señalización de N1 mediada a través de mJ1 en un sistema totalmente murino es coherente con su unión reducida a J1 murina frente a la humana (figuras 3 y 4), como consecuencia de la contribución de E228 al epitopo y su incapacidad funcional para bloquear con eficacia la unión de mJ1 a N1 (figura 1). Estos datos sugieren que los cuatro anticuerpos dirigidos al dominio DSL son funcionalmente específicos para bloquear la unión y señalización de N1 mediada por la J1 humana, y no por la murina, a pesar de su unión débil a la J1 murina. La capacidad de los anticuerpos para unirse a J1 de rata (figura 4D) sugiere que pueden ser capaces de inhibir la señalización de Notch inducida por J1 de rata. En efecto, ambos anticuerpos J1-65D y J1-183D inhiben con eficacia la señalización de Notch en células MDA-MB-231 y HUVEC estimuladas con la proteína de fusión de Jagged 1 de rata recombinante-Fc (figura 10B). Estos datos demuestran que la capacidad de los anticuerpos para unirse al ligando J1 de rata es suficiente para bloquear su

actividad de señalización de Notch.

Ejemplo 6: Inhibición del crecimiento tumoral *in vitro* usando un ensayo basado en esferoides tridimensionales

Bajo condiciones de crecimiento bidimensional convencionales, los mAb de J1 no inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama MDA-MB-231 (los datos no se muestran). También se han indicado descubrimientos similares para los mAb anti-N1 de Merck cuando se ensayan en la línea celular LS-1034 [66]. Puesto que se requiere un contacto célula-célula para activar la señalización de Notch, se usó un modelo de crecimiento tridimensional basado en esferoides para ensayar la capacidad de los mAb de J1 para bloquear el crecimiento tumoral. Además, el modelo tridimensional imita mejor las condiciones *in vivo*, que incluyen la hipoxia y la acidosis, permitiendo la evaluación del efecto de los mAb en un escenario más realista. Se generaron esferoides a partir de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y se evaluó la capacidad de diferentes concentraciones del mAb J1-65D para inhibir su crecimiento. Se observó la máxima inhibición del crecimiento a una concentración mínima de anticuerpo de 5 µg/ml (figura 11A). Puesto que 10 µg/ml produjo una represión transcripcional ligeramente mejor del gen diana de Notch *HES1* y la citoquina protumorigénica *IL6* (figura 11B y 11C, respectivamente), se seleccionó esta concentración para posteriores experimentos.

Se generaron esferoides con líneas de células de cáncer de mama que expresan niveles diferentes de J1 (figura 12A), y se controló su crecimiento bajo un tratamiento con mAb de J1. Se descubrió que el nivel de inhibición de crecimiento por los mAb de J1 se correlaciona estrictamente con los niveles de expresión de J1. De hecho, no se observó un efecto significativo para células MCF7 (niveles de J1 casi indetectables) (figura 12B), mientras que se observó un efecto inhibitorio del crecimiento gradualmente creciente para las líneas celulares MDA-MB-468 (niveles intermedios de J1) y MDA-MB-231 (niveles altos de J1) (figura 12C, D). En MDA-MB-231, ambos mAb J1-65D y J1-183D bloquearon el crecimiento de los esferoides con una eficacia comparable al inhibidor de pan-Notch DBZ (figura 12D y figura 13A). Se confirmó la inhibición de la señalización de Notch mediante qPCR para la represión de la expresión del gen diana de Notch *HES1* (figura 13B).

El mecanismo mediante el cual los anticuerpos de J1 inhiben el crecimiento tumoral se investigó mediante inmunotinción, análisis citométrico de flujo y qPCR de esferoides recolectados al final del experimento. Los estudios inmunohistoquímicos identificaron efectos mínimos sobre la proliferación, medidos mediante el porcentaje de células Ki67⁺ (figura 13C). Se observó una reducción en la frecuencia de células CD44⁺/CD24⁻ (figura 13D), una población enriquecida en células madre del cáncer, y en las células madre y progenitoras que expresan aldehído deshidrogenasa (figura 13E). Estos datos sugieren que los anticuerpos de bloqueo de Jagged 1 disminuyen las células madre del cáncer de mama en esferoides de MDA-MB-231 tratados. El análisis de la expresión de otros genes previamente implicados en la biología del cáncer de mama mediante qPCR identificó una expresión reducida de los genes implicados en el crecimiento y la supervivencia, *IL6* (figura 13F) [67, 68] y *CA9* (los datos no se muestran) [69, 70]. Un aumento de expresión del marcador epitelial *E-cadherina* y de *PRRX1* (figura 13F) es una posible indicación de la inversión de la transición epitelial a mesenquimática [71-73], como también lo sugiere la propia reducción de *IL6*.

Ejemplo 7: Efectos aditivos de una combinación con quimioterapia sobre la inhibición del crecimiento tumoral *in vitro* usando un ensayo basado en esferoides tridimensionales

Se trataron esferoides tridimensionales de cáncer de mama MDA-MB-231 con el anticuerpo J1-65D o J1-183D en combinación con dosis subletales de los fármacos que se emplean habitualmente en el cáncer de mama paclitaxel (figura 14A) o doxorubicina (figura 14B). Ambos tratamientos de combinación demostraron ser más eficaces en la reducción del crecimiento de los esferoides que cualquiera de los tratamientos por sí solo.

Ejemplo 8: Inhibición de la estimulación del crecimiento tumoral mediado por la sobreexpresión de J1 *in vitro* e *in vivo*

Células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células de glioma U87 fueron transducidas de forma estable con retrovirus que codifican la proteína J1 humana. Se investigó su crecimiento *in vitro* mediante el cocultivo de las células parenterales con células que sobreexpresan J1. Se usaron células transducidas con vectores como control (figura 15A). En ambas líneas celulares, la sobreexpresión de J1 estimula significativamente el crecimiento celular, puesto que las células transducidas con J1, pero no las células transducidas por el vector, crecieron más que sus células parenterales a lo largo del tiempo. En un modelo *in vivo* en el que ratones atímicos ("nude") BALB/c recibieron un xenoinjerto con células U87 estables, la proteína J1 humana confirió una ventaja de crecimiento *in vivo* significativa sobre el crecimiento de los xenoinjertos de U87 (figura 15B).

Se investigó la capacidad de los mAb de bloqueo de J1 (J1-65D y J1-183D) para inhibir el crecimiento tumoral potenciado dependiente de la sobreexpresión de Jagged 1 humana (figura 16). A una dosis de 10 mg/kg, los mAb de bloqueo retrasaron significativamente el crecimiento tumoral inducido por J1 (figura 16A). Mientras que a 20 mg/kg, el anticuerpo J1-65D abolió completamente el crecimiento tumoral potenciado estimulado por la sobreexpresión de Jagged 1 humana, el anticuerpo J1-183D fue considerablemente más eficaz cuando se administra a una dosis menor (figura 16B).

Ejemplo 9: Inhibición del crecimiento de xenoinjertos tumorales *in vivo*

Se empleó un modelo de xenoinjerto en el que se usaron células de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 inyectadas en ratones atímicos BALB/c para investigar el efecto de los mAb de bloqueo de J1 (J1-65D y J1-183D) sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Cuando los mAb se inyectan al mismo tiempo que el injerto del tumor, seguido de una inyección cada 3 o 4 días, a la dosis de 10 mg/kg los mAb de bloqueo son capaces de frenar el crecimiento del tumor, comparado con el grupo control (figura 17A). El mAb de bloqueo J1-183D muestra la inhibición más potente (con una reducción en el crecimiento significativa a lo largo de 30 días), y J1-187B y J1-65D muestran una inhibición modesta. A 20 mg/kg, ambos mAb de bloqueo (J1-65D y J1-183D) inhiben significativamente el crecimiento del tumor durante los primeros 36 días (figura 17C).

Se desarrollaron cebadores de PCR específicos de especie y se ensayaron para analizar individualmente la expresión de genes diana de Notch humanos o murinos en xenoinjertos de MDA-MD-231 recolectados al final del experimento ilustrado en figura 17A (figura 17B). Los genes diana de Notch humanos se expresan en células tumorales xenoinjertadas, mientras que los genes diana de Notch murinos se expresan en células murinas en el microentorno y la vasculatura del tumor. Independientemente de que los anticuerpos inhiban funcionalmente solo la proteína J1 humana o de que también actúen sobre la proteína J1 murina, el diálogo entre los receptores/ligandos murinos y humanos y los efectos sobre la vascularidad del tumor ofrecen la oportunidad de que incluso los anticuerpos específicos de J1 humana alteren la expresión de los genes diana de Notch murinos.

El análisis inicial indica que la expresión del transcrito *HES-1* humano fue significativamente reprimida por el anticuerpo J1-65D, mientras que se observó una represión no significativa usando J1-183D. Se observó una tendencia no significativa hacia la represión de *Hey2* murino en xenoinjertos tratados con cada mAb de J1, lo cual sugiere que no se consiguió establecer eficazmente como diana la señalización de Notch estromática mediada por J1 murina. Estos datos confirman la represión *in vivo* de la vía de Notch en xenoinjertos de cáncer de mama tratados con mAb de J1, pero sugieren que el grado de represión de *HES1* no indica si los mAb tienen el mayor efecto sobre el crecimiento del tumor.

Ejemplo 10: Los anticuerpos humanizados y desimmunizados conservan su especificidad y funcionalidad *in vitro*

Se subcontrató la humanización y la desimmunización a Lonza Biologies plc. Otras modificaciones de las proteínas incluyeron la evitación/eliminación de modificaciones postraduccionales potenciales y la minimización de cambios en el punto isoelectrónico. Se diseñaron por ordenador cuatro variantes de cadena ligera y cuatro variantes de cadena pesada y se combinaron para generar 16 variantes de anticuerpos para J1-65D y J1-183D (tabla 5). También se construyó un anticuerpo quimérico que contiene las CDR no alteradas.

Tabla 5. Secuencias de la región CDR de los anticuerpos humanizados/desimmunizados J1-65D y J1-183D

	CDR1	CDR2	CDR3
J1-65D_VL de tipo salvaje	RASGNIHNYLA (SEQ ID NO:1)	NAKTLADDI (SEQ ID NO:2)	QHFWSAPWT (SEQ ID NO:3)
J1-65D_VL_1	RASGNIHNYLA (SEQ ID NO:1)	NAKTLADDV (SEQ ID NO:26)	QHFWSAPWT (SEQ ID NO:3)
J1-65D_VL_2	RASGNIHNYLA (SEQ ID NO:1)	NAKTLADDV (SEQ ID NO:27)	QHFWSAPWT (SEQ ID NO:3)
J1-65D_VL_3	RASGNIHNYLA (SEQ ID NO:1)	NAKTLADDV (SEQ ID NO:27)	QHFWSAPWT (SEQ ID NO:27)
J1-65D_VL_4 NB no funcional	RAS QG NIHNYLA (SEQ ID NO:25)	NAKTLADDV (SEQ ID NO:27)	QQ FWSAPWT (SEQ ID NO:28)
J1-65D_VH de tipo salvaje	DYEMH (SEQ ID NO:4)	QPGGGGTAYNQKFKG (SEQ ID NO:5)	RGYDDYPFAY (SEQ ID NO:6)
J1-65D_VH_1	DYEMH (SEQ ID NO:4)	QPGGGGTAYNQKFKG (SEQ ID NO:5)	RGYDDYPFAY (SEQ ID NO:6)
J1-65D_VH_2	DYEMH (SEQ ID NO:4)	QPGGGGTAYA Q KFKG (SEQ ID NO:29)	RGYDDYPFAY (SEQ ID NO:6)
J1-65D_VH_3	DYEMH (SEQ ID NO:4)	QPGGGGTAYA Q K Q G (SEQ ID NO:30)	RGYDDYPFAY (SEQ ID NO:6)
J1-65D_VH_4	DYEMH (SEQ ID NO:4)	QPGGGGTAYA Q K Q G	RGYDDYPFAY (SEQ ID NO:6)

ES 2 724 244 T3

		(SEQ ID NO:30	NO:6)			(SEQ ID	ID	QHHYDIPWT	(SEQ ID	ID
J1-183D_VL salvaje	de tipo	RTSENIYSYLT (SEQ ID NO:13)	NAKILAAGV (SEQ ID NO:14)	QHHYDIPWT (SEQ ID NO:15)						
J1-183D_VL_1		RTSENIYSYLT (SEQ ID NO:13)	NAKILAAGV (SEQ ID NO:14)	QHHYDIPWT (SEQ ID NO:15)						
J1-183D_VL_2		RTSENIYSYLT (SEQ ID NO:13)	NAKTLASGV (SEQ ID NO:31)	QHHYDIPWT (SEQ ID NO:15)						
J1-183D_VL_3		RTSENIYSYLT (SEQ ID NO:13)	NAKILDSGV (SEQ ID NO:32)	QHHYDIPWT (SEQ ID NO:15)						
J1-183D_VL_4		RTSENIYSYLT (SEQ ID NO:13)	HAKILDSGV (SEQ ID NO:33)	QHHYDIPWT (SEQ ID NO:15)						
J1-183D_VH salvaje	de tipo	DYAIH (SEQ ID NO:16)	NTYYGDSKYNQKFKD (SEQ ID NO:17)	GYDGFAY (SEQ ID NO:18)						
J1-183D_VH_1		DYAIH (SEQ ID NO:16)	NTYYGDSKYNQKFKD (SEQ ID NO:17)	GYDGFAY (SEQ ID NO:18)						
J1-183D_VH_2		DYAIH (SEQ ID NO:16)	NTYYGDSKY AQKFQG (SEQ ID NO:34)	GYDGFAY (SEQ ID NO:18)						
J1-183D_VH_3		DYAIH (SEQ ID NO:16)	NTYYGDSKY AQKFQG (SEQ ID NO:34)	GYDGFAY (SEQ ID NO:18)						
J1-183D_VH_4		DYAIH (SEQ ID NO:16)	NTYYGDSKY AQKFQG (SEQ ID NO:34)	GYDGFAY (SEQ ID NO:18)						

Las zonas en negrita indican diferencias en aminoácidos con respecto a las secuencias de CDR originales.

El rendimiento de proteínas de estos anticuerpos, sus niveles de agregados solubles y su afinidad de unión al inmunógeno (J1-DE3) se ilustran en la tabla 6. Con la excepción de los variantes de J1-65D que contienen la cadena ligera VL4 (que carece de la afinidad adecuada por el antígeno de J1), todos los anticuerpos mostraron unos rendimientos, niveles de agregados y afinidad aceptables.

5

Tabla 6. Resumen de los variantes de humanización J1-65D y J1-183D expresados de modo transitorio

Variante J1-65D	de	Cadena pesada	Cadena ligera	Conc. (µg/ml)	Rendim. (mg)	% de agregados solubles	K_D (pM)
J1-65D murino	-	-	-	1000	-	0,93	130
J1-65D quimérico	J1-65D_VL	J1-65D_VH	J1-65D_VH	295	5,3	0	18,8--106
J1-65D variante 1	J1-65D_VL_1	J1-65D_VH_1	J1-65D_VH_1	200	3,6	0	150
J1-65D variante 2	J1-65D_VL_1	J1-65D_VH_2	J1-65D_VH_2	165	3,0	0	165
J1-65D variante 3	J1-65D_VL_1	J1-65D_VH_3	J1-65D_VH_3	295	5,3	1,67	158
J1-65D variante 4	J1-65D_VL_1	J1-65D_VH_4	J1-65D_VH_4	200	3,6	0	94,9
J1-65D variante 5	J1-65D_VL_2	J1-65D_VH_1	J1-65D_VH_1	170	3,1	0	44,6
J1-65D variante 6	J1-65D_VL_2	J1-65D_VH_2	J1-65D_VH_2	230	4,1	0	223

ES 2 724 244 T3

J1-65D variante 7	J1-65D_VL_2	J1-65D_VH_3	250	4,5	0	151
J1-65D variante 8	J1-65D_VL_2	J1-65D_VH_4	250	4,5	0	71,7
J1-65D variante 9	J1-65D_VL_3	J1-65D_VH_1	160	2,9	0	13,9
J1-65D variante 10	J1-65D_VL_3	J1-65D_VH_2	285	5,1	0,59	293
J1-65D variante 11	J1-65D_VL_3	J1-65D_VH_3	310	5,6	1,00	243
J1-65D variante 12	J1-65D_VL_3	J1-65D_VH_4	315	5,7	0,47	80,6
J1-65D variante 13	J1-65D_VL_4	J1-65D_VH_1	130	2,3	2,82	14200
J1-65D variante 14	J1-65D_VL_4	J1-65D_VH_2	305	5,5	6,61	58300
J1-65D variante 15	J1-65D_VL_4	J1-65D_VH_3	255	4,6	5,29	39800
J1-65D variante 16	J1-65D_VL_4	J1-65D_VH_4	245	4,4	5,60	52100

Variante	de	Cadena pesada	Cadena ligera	Conc. (µg/ml)	Rendim. (mg)	% agregados solubles	de	K_D (nM)
J1-183D murino	-	-	-	1000	-	2,32	-	0,58
J1-183D quimérico	J1-183D_VL	J1-183D_VH	-	180	3,2	1,41	-	0,39--1,35
J1-183D variante 1	J1-183D_VL_1	J1-183D_VH_1	-	260	4,7	3,65	-	0,77
J1-183D variante 2	J1-183D_VL_1	J1-183D_VH_2	-	260	4,7	3,58	-	2,19
J1-183D variante 3	J1-183D_VL_1	J1-183D_VH_3	-	260	4,7	2,87	-	2,55
J1-183D variante 4	J1-183D_VL_1	J1-183D_VH_4	-	210	3,8	0,85	-	2,76
J1-183D variante 5	J1-183D_VL_2	J1-183D_VH_1	-	250	4,5	4,38	-	2,75
J1-183D variante 6	J1-183D_VL_2	J1-183D_VH_2	-	240	4,3	4,6	-	1,39
J1-183D variante 7	J1-183D_VL_2	J1-183D_VH_3	-	230	4,1	3,92	-	1,26
J1-183D variante 8	J1-183D_VL_2	J1-183D_VH_4	-	205	3,7	0,93	-	1,48
J1-183D variante 9	J1-183D_VL_3	J1-183D_VH_1	-	290	5,2	3,49	-	0,68
J1-183D variante 10	J1-183D_VL_3	J1-183D_VH_2	-	290	5,2	2,89	-	1,77

J1-183D variante 11	J1-183D_VL_3	J1-183D_VH_3	350	6,3	2,5	2,82
J1-183D variante 12	J1-183D_VL_3	J1-183D_VH_4	290	5,2	0,66	2,61
J1-183D variante 13	J1-183D_VL_4	J1-183D_VH_1	300	5,4	3,43	1,50
J1-183D variante 14	J1-183D_VL_4	J1-183D_VH_2	300	5,4	3,02	3,91
J1-183D variante 15	J1-183D_VL_4	J1-183D_VH_3	250	4,5	2,21	5,47
J1-183D variante 16	J1-183D_VL_4	J1-183D_VH_4	290	5,2	0,72	4,86

5 La capacidad de los variantes de anticuerpos humanizados J1-65DV1-16 (figura 18A) y J1-183DV1-16 (figura 18B) para unirse a la J1 humana de la superficie celular se comparó con la del anticuerpo quimérico, que conserva las secuencias de CDR parentales. Con la excepción de J1-65DV13-16 (cadena ligera VL4 común), todos los variantes conservaron una actividad de unión a J1 y una especificidad comparables a las del anticuerpo quimérico. Ninguno de los variantes mostró actividad de unión a J2. Los variantes de anticuerpos humanizados J1-65DV1-16 (figura 19A) y J1-183DV1-16 (figura 19B) también conservaron su especificidad por la J1 humana y no se unen a la proteína J1 murina.

10 Se realizó el ensayo de unión basado en FACS usando una proteína recombinante N1 EGF11-13 humana soluble biotinilada unida a esferas revestidas de avidina para teñir células que expresan J1 usando una dilución en serie de cada mAb variante para ensayar su capacidad para bloquear la unión de J1 a N1 mediante FACS (tabla 7). Con la excepción de J1-65DV13-16 (cadena ligera VL4 común), todos los variantes conservaron una actividad de bloqueo *in vitro* comparable a la de su anticuerpo parental y quimérico. Por tanto, 12/16 de los variantes de J1-65D1 V1-12 y todos los variantes J1-183D tienen la actividad de unión y de bloqueo deseada.

15 Tabla 7. Bloqueo de la unión de Notch 1 al Jagged 1 de la superficie celular

		Concentración final de anticuerpo				
		0,2 µg/ml	0,4 µg/ml	0,6 µg/ml	1,0 µg/ml	2,0 µg/ml
J1-65D murino	X	+	≤+	+	+	ND
Quimérico	X	+	+	+	+	ND
V1	X	+	+	+	+	ND
V2	X	+	+	+	+	ND
V3	X	+	+	+	+	ND
V4	X	+	+	+	+	ND
V5	X	+	+	+	+	ND
V6	X	+	+	+	+	ND
V7	X	+	+	+	+	ND
V8	X	+	+	+	+	ND
V9	X	+	+	+	+	ND
V10	X	+	+	+	+	ND
V11	X	+	+	+	+	ND
V12	X	+	+	+	+	ND

ES 2 724 244 T3

V13	ND	ND	ND	Ligera inhib.	Parcial
V14	ND	ND	ND	X	Parcial
V15	ND	ND	ND	X	Parcial
V16	ND	ND	ND	X	Parcial
J1-183D murino	X	+	≤+	+	ND
Quimérico	X	+	+	+	ND
V1	X	+	+	+	ND
V2	X	+	+	+	ND
V3	X	+	+	+	ND
V4	X	+	+	+	ND
V5	X	+	+	+	ND
V6	X	+	+	+	ND
V7	X	+	+	+	ND
V8	X	+	+	+	ND
V9	X	+	+	+	ND
V10	X	+	+	+	ND
V11	X	+	+	+	ND
V12	X	+	+	+	ND
V13	X	+	+	+	ND
V14	X	+	+	+	ND
V15	X	+	+	+	ND
V16	X	+	+	+	ND

ND, no determinado.
+, bloqueo completo.
X, sin bloqueo.

5 Tras establecer que los mAb de J1 humanizados y desimmunizados son capaces de bloquear la unión del ligando J1 a su receptor N1, se investigó su efecto sobre la actividad de la vía de señalización de Notch. La línea de células de
10 cáncer colorrectal LS174T, que expresa de modo estable un gen indicador de luciferasa bajo el control del cofactor de Notch RBPJ, se estimuló con proteína J1 inmovilizada (N-terminal a EGF3), que activa con eficacia la actividad del gen indicador de luciferasa, y esta inducción fue bloqueada por el inhibidor de γ -secretasa DBZ, un inhibidor de pan-Notch (figura 20). Cuando se añaden los mAb de J1 humanizados seleccionados (J1-65DV4, V5, V8, V9, V12 o J1-183DV1, V8, V9) o anticuerpos al sistema de cultivo, la actividad luciferasa fue inhibida de una manera tan eficaz como el mAb murino parental.

15 También se investigó la capacidad de los anticuerpos humanizados y desimmunizados para inhibir el crecimiento tridimensional de esferoides de cáncer de mama MDA-MB-231. Se seleccionó una concentración de anticuerpo de 5 μ g/ml para este experimento para determinar si la reducción de la concentración del mAb ayudaría a identificar las diferencias funcionales entre los variantes humanizados. Para los variantes de J1-65D (figura 21), todos los ensayos redujeron significativamente el crecimiento de los esferoides, comparado con el mlgG1 control. La capacidad de J1-65DV5 y J1-65DV9 para inhibir el crecimiento de esferoides es más comparable con la del mAb parental (figura 21), mientras que los variantes J1-65DV4, 8 y 12 muestran una capacidad ligeramente reducida para inhibir el crecimiento de los esferoides. Para los variantes de J1-183D (que, en general, muestran una menor afinidad por J1 que los variantes de J1-65D), todos los ensayos redujeron significativamente el crecimiento de esferoides comparado con el mlgG1 control, pero globalmente presentaron diferencias más notables en su capacidad para inhibir el crecimiento de los esferoides (figura 22). J1-183DV1 mostró una eficacia casi comparable con el anticuerpo murino original, mientras que los variantes 9, 8, 12 y 15 mostraron un efecto cada vez menor. Esto se corresponde en gran medida con su afinidad por Jagged 1, lo cual destaca su importancia funcional en este

ensayo. Globalmente, estos datos identifican un panel de anticuerpos humanizados de bloqueo y de unión a J1 que conservan la capacidad funcional del mAb murino parental para inhibir la señalización de Notch y el crecimiento tumoral *in vitro*.

Los siguientes materiales y métodos ejemplifican los usados por los presentes inventores.

5 *Generación de anticuerpos monoclonales anti-J1*

Se expresó parte de la región extracelular de J1 humana que contiene el dominio DSL y las 3 repeticiones de EGF adyacentes (aminoácidos 185-335) con un marcador de His6 N-terminal y un marcador de biotilación C-terminal en *E. coli* NM554 como se ha descrito previamente [65]. Se expresó una construcción similar que codifica el dominio DSL (aminoácidos 185-230) de un modo similar. Las proteínas se purificaron a partir del lisado celular mediante una cromatografía de afinidad con Ni²⁺, se volvieron a plegar *in vitro* y después se purificaron mediante FPLC de intercambio aniónico y HPLC en fase inversa. Un péptido reducido derivado del dominio DSL (aminoácidos 197-214, NKFCRPRDDFFGHYACDQ (SEQ ID NO:35)) fue sintetizado comercialmente por GenScript, se volvió a plegar y se conjugó con hemocianina de lapa.

Se inmunizaron ratones MF1 (hembras de 6-8 semanas) con los péptidos o proteínas purificadas siguiendo un protocolo convencional, concretamente 100 µg por inmunización en cada ratón cada 10 días tres veces. Cuarenta días después de la primera inmunización, se administró una inmunización de refuerzo y las fusiones se realizaron dos días después. Se siguió el protocolo de fusión convencional con células NS0 como compañero de fusión y se dejó que los hibridomas crecieran con selección de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT).

Se seleccionaron los sobrenadantes de hibridoma para la presencia de anticuerpos segregados que fueran reactivos con el inmunógeno mediante ELISA. Después las líneas celulares positivas se clonaron mediante dilución limitante. Los sobrenadantes procedentes de los hibridomas después se seleccionaron para la unión a células HEK293T transfectadas con J1 humana y para el bloqueo de la unión de la proteína soluble N1 humana a células transfectadas con J1.

Se produjeron anticuerpos purificados adaptando las células de hibridoma a un medio sin suero o mediante el cultivo en masa de células en medio sin suero, seguido de una purificación con proteína A o proteína G. Los anticuerpos purificados se volvieron a ensayar para la especificidad de unión y el bloqueo mediante análisis ELISA y FACS.

ELISA para identificar mAb que se unen a Jagged 1

Se revistieron placas MaxiSorp de 96 pocillos con el antígeno J1 apropiado a 10 µg/ml en PBS a 4 °C durante la noche. Después las placas se lavaron con PBS/Tween-20 al 0,1% y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas de nuevo se lavaron antes de añadir los sobrenadantes de hibridoma y se incubaron durante 1 h. Después de lavar, se añadió un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP a una dilución de 1:1000 a cada pocillo y se incubó durante 1 h. Se añadió el sustrato ABTS a cada pocillo después de lavar y se midió la DO405nm con un lector de placas a los 5-30min.

Construcciones de expresión

Se adquirió el clon IMAGE para la J1 humana de longitud completa en SourceBioscience y se amplificó la secuencia del marco de lectura abierto mediante PCR y se clonó direccionalmente en el vector de expresión pEGFP-N1. Se adquirió el vector de expresión de J2 de longitud completa humana marcado con Myc-DDK en Origene Technologies. Las DLL4 y mJ1 humanas se han descrito previamente [25]. Para expresar J1-DSL-EGF3 humana y murina sobre la superficie celular, se construyó un vector de expresión basado en pEGFP-N1 para expresar una molécula CD1b marcada en el N-terminal (que incluye su dominio α3, la región transmembrana y la cola citoplásmica) condensada con EGFP en el C-terminal. Se amplificaron secuencias de ADNc que codifican J1-DSL-EGF3 humana y murina mediante PCR y se clonaron direccionalmente en el anterior vector. Se compararon las secuencias de aminoácidos de J1 de conejo y de cobaya con la humana, y la construcción de J1 humana marcada con FLAG-EGFP se mutó en consecuencia para generar construcciones de J1 de conejo (I275T) y de cobaya (R231K, L247I, D250N, I275T, N277I). La construcción de J1 murina marcada con FLAG-EGFP se mutó para generar la construcción de rata (D228E).

Análisis de FACS con un anticuerpo anti-J1

Células HEK293 transfectadas con construcciones de J1, J2 humanas o DSL-EGF3 marcada con FLAG-EGFP, células B16F10 transfectadas con DLL4 humana o J1 de ratón, y líneas de células de cáncer humanas se tiñeron con anticuerpos anti-J1 purificado a 10 µg/ml diluidos en tampón de lavado de FACS (FBS al 2% en PBS + azida de sodio al 0,1%) o sobrenadantes de hibridoma puros, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con alofococianina (APC) a una dilución de 1:200; para los anticuerpos primarios murinos se empleó anti-APC de ratón de cabra (eBioscience); para los anticuerpos humanizados y quiméricos se usó un anticuerpo secundario anti-IgG humana de cabra (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de lavar, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 1% (en PBS) y se adquirieron con un FACSCalibur. Los datos de FACS se analizaron con el programa FlowJo (TreeStar Inc.). En algunos casos, se usaron los anticuerpos J1-65D y J1-183D conjugados con

APC (por ejemplo, figura 4E).

Análisis de inmunotinción de anticuerpos anti-J1

Se incubaron preparaciones de células citocentrifugadas fijadas con acetona de transfectantes HEK293 de J1 y J2 con el sobrenadante de hibridoma no diluido durante 30 min a temperatura ambiente. Se usó el anticuerpo monoclonal de J2 MHJ2-523 (Biologend) como control positivo para la tinción de J2 a una dilución de 1:50. Después de dos lavados en PBS, los portaobjetos se incubaron con una dilución 1:50 de anticuerpo policlonal antiinmunoglobulinas de ratón de cabra/HRP (Dako, P0447) durante 30 min a temperatura ambiente. Se usó el anticuerpo policlonal antiinmunoglobulinas de cabra de conejo/HRP (Dako, P0449) para el portaobjetos teñido con anticuerpo policlonal de J1 de cabra a una dilución de 1:25. Después de dos lavados en PBS se reveló una reacción de color usando el kit de sistema de detección REAL Envision, con peroxidasa/DAB+, conejo/ratón (Dako, K5007). Los portaobjetos se lavaron y se contratiñeron en hematoxilina de Harris antes de montar en agente de montaje Aquatex (BDH/VWR, 63123S).

Inmunohistoquímica

Brevemente, se eliminó la cera de secciones de esferoides introducidos en parafina y se sometieron a un extracción de antígenos inducida por calor bajo presión en un horno de microondas a 750 W durante 10 minutos (tampón de extracción, citrato, pH 6; Dako). Las secciones se incubaron con el Ab específico de Ki67 (M7240; Dako; 1:50) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se detectó el Ab unido usando el sistema Envision (DAKO Cytomation, Ely, Cambridgeshire, Reino Unido), se visualizó empleando el cromógeno 2,3-diaminobenzidina y se contratiñó con hematoxilina.

Ensayo de bloqueo de la unión de Notch

Se expresó N1 EGF11-13 humano (411-526) en *E. coli*, se volvió a plegar *in vitro* y se marcó con esferas revestidas de avidina fluorescente morada (Spherotech) tal como se ha descrito previamente [74]. Células HEK293 transfectadas con J1 humana o células B16F10 transfectadas con J1 de ratón se tiñeron con esferas fluorescentes de N1 en presencia de sobrenadantes de anticuerpo de J1 o anticuerpo purificado (murino, quimérico o humanizado) diluido en HBBS/FCS al 10%. Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón de tinción antes de analizarse con un FACSCalibur y de realizar el análisis de los datos con CellQuest. Células HEK293 transfectadas con Jagged 2 humana y células B16F10 transfectadas con DLL4 humana y de ratón se tiñeron de forma similar para ensayar la especificidad de bloqueo .

Ensayo de bloqueo de la unión de CD46

Se revistió una placa MaxiSorp de 96 pocillos con CD46 (CCP1-CCP3) a una concentración de 5 µg/ml en disolución salina tamponada con Tris y se incubó a 4 °C durante la noche. La placa se bloqueó a 4 °C en HEPES 20 mM, pH 7,4, BSA al 1% durante la noche. Después se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en tampón ELISA: HEPES 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 10 mM, Tween 20 al 0,005%, NP40 al 0,25%, BSA al 4% que contenía J1 DSL-EGF3 biotinilado (0,5 µg/ml) en ausencia o en presencia de una dilución 1:10 de cada sobrenadante de hibridoma. Después de 5 lavados con tampón ELISA, la placa se incubó con una dilución 1:1000 de conjugado de neutravidina-HRP (Invitrogen). La placa se lavó 6 veces y se reveló con sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich).

Ensayo de bloqueo de la unión del anticuerpo

Se biotinilaron mAb de J1 purificados usando el kit de sulfo-NHS-biotinilación EZ-link Micro Sulfo-NHS-Biotinylation (Fisher Scientific) según el manual del fabricante. Se emplearon los mAb biotinilados para teñir células HEK293 transfectadas de modo estable con J1 a 1,0 µg/ml en presencia de mAb de J1 no biotinilados a diversas concentraciones durante 20 min a 4 °C. Después de lavar se usó estreptavidina-PE (Sigma-Aldrich, 1:200) para detectar la tinción del mAb de J1 biotinilado y se incubó durante 20 min a 4 °C en la oscuridad. Las muestras después se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 1% antes del análisis con un FACSCalibur. Los datos de FACS se analizaron con el programa FlowJo (TreeStar, California).

Resonancia de plasmón de superficie

Se ensayaron las afinidades de unión de mAb de J1 murinos por diferentes formas de proteína soluble J1 con un BIAcore T-3000. Los mAb de J1 se inmovilizaron a través de un acoplamiento de amina primaria a la superficie del chip. Las proteínas solubles J1 se hicieron pasar sobre el chip en HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%. Las titulaciones se realizaron a través del intervalo de concentración de 0,8 nM a 10 nM (con 7,8 nM a 100 nM para J1-187B), con un caudal de 10 µl/min a 25 °C.

Generación de una línea celular estable de J1

Se clonó el ADNc de longitud completa de J1 usando un vector de retrovirus LZRSpBMN-conector-IRES-EGFP. Se transfectaron células HEK293T con la construcción del virus y la mezcla de encapsulación, y las partículas del virus

se recolectaron a las 24, 48 y 72 h después de la transfección. Los sobrenadantes de cultivo que contenían los virus se filtraron con unidades de filtro de jeringa de 0,45 µm y se aplicaron a las células diana MDA-MB-231 y U87. Las células se cultivaron durante 7 días, se dividieron y se cambió el medio cuando fue necesario. Después las poblaciones con una alta expresión de GFP se seleccionaron con FACS y se expandieron en cultivo. Se confirmó que la expresión de J1 se correlacionaba con la expresión de GFP mediante tinción con FACS. En paralelo, también se generaron células transducidas con el vector vacío.

Inactivación de J1

Se adquirió el ARNhc Mission (secuencia CCGGGTGCACCTCTGACTCCTATTACTCGAGTAATAGGAGTCAGAGG TGCACCTTTTTG (SEQ ID NO:36)) en el vector de lentivirus TRC2 (Sigma-Aldrich) y se generaron partículas de lentivirus mediante la cotransfección de células HEK293T con los plásmidos de encapsulamiento (Invitrogen) y los plásmidos de lentivirus. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo que contenían las partículas de virus a la 24, 48 y 72 h después de la transfección, y se filtraron con unidades de filtro de jeringa de 0,45 µm. Después las partículas de virus se aplicaron a las células diana MDA-MB-231 y las células se cultivaron durante 7 días, se dividieron y se cambió el medio cuando fue necesario, antes de ensayar su nivel de expresión de J1 mediante FACS como se describió anteriormente.

Cartografiado de epítomos por transferencia por puntos de los mAb de J1

Se introdujeron mutaciones de sentido incorrecto para generar Y190H, F199A, R201A, R203A, F207A, N215A, E228D y R231K en la construcción J1 DSL-EGF3, en el plásmido recombinante pQE30 que contiene la secuencia de ADNc de la construcción de tipo salvaje mediante mutagénesis específica dirigida a sitio basada en PCR con la ADN polimerasa *Pfu*. Se confirmó la generación de la mutación deseada mediante secuenciación del ADN. Las construcciones mutantes se purificaron como se describió para el J1 DSL-EGF3 BirA de tipo salvaje. Las masas se confirmaron mediante análisis espectral de masas con ionización de electronebulización ("Electrospray Ionisation Mass Spectral analysis", ESI-MS). Se prepararon las construcciones de tipo salvaje y mutantes a una concentración adecuada para la detección y se roció 1 µl sobre nitrocelulosa. Las proteínas se detectaron con los sobrenadantes de hibridoma diluidos o mAb purificado a las concentraciones que aparecen en las leyendas de la figura, seguido de un conjugado de anti-ratón-HRP (1:1000) y se visualizaron mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL más sistema de detección por transferencia Western).

Extracción de ARN total, transcripción inversa y PCR a tiempo real cuantitativa

Se aisló el ARN total de los cultivos de células/esferoides usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 0,5-1 µg del ARN total usando el sistema de primera hebra Superscript III (Invitrogen). Se realizó un análisis de PCR cuantitativa (qPCR) por triplicado usando SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen) y el detector de fluorescencia Chromo4 (MJ Research, EE. UU.). La cuantificación relativa se realizó usando el método $\Delta\Delta C_t$ normalizado al gen de $\beta 2$ -microglobulina o la expresión de β -actina murina. Para las secuencias de los cebadores, véase la siguiente tabla.

Gen	Secuencia del cebador
<i>$\beta 2$-microglobulina humana</i>	directo: 5'- TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT -3' (SEQ ID NO:37)
	inverso: 5'- TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT -3' (SEQ ID NO:38)
<i>HES1 humana</i> (usada para las muestras <i>in vitro</i>)	directo: 5'- GCTGGAGAAGGCGGACATTC -3' (SEQ ID NO:39)
	inverso: 5'- AAGCGGGTCCACTCGTTCAT -3' (SEQ ID NO:40)
<i>HES1 humana</i> (usada para las muestras <i>in vivo</i>)	directo: 5'- TGCTCTGAAGAAAGATAGCTCG -3' (SEQ ID NO:41)
	inverso: 5'- CGGAGGTGCTTCACTGTCAT -3' (SEQ ID NO:42)

<i>IL6 humana</i>	directo: 5'- AGTGAGGAACAAGCCAGAGC -3' (SEQ ID NO:43)
	inverso: 5'- GGCATTGTGGTTGGGTCAG -3' (SEQ ID NO:44)
<i>E-cadherin humana</i>	directo: 5'- CCCACCACGTACAAGGGTC -3' (SEQ ID NO:45)
	inverso: 5'- CTGGGGTATTGGGGGCATC -3' (SEQ ID NO:46)
<i>PRRX1 humana</i>	directo: 5'- CTGATGCTTTTGTGCGAGAA -3' (SEQ ID NO:47)
	inverso: 5'- ACTTGGCTCTTCGGTTCTGA -3' (SEQ ID NO:48)
<i>β-actina murina</i>	directo: 5'- CTAAGGCCAACCGTGAAAAG -3' (SEQ ID NO:49)
	inverso: 5'- ACCAGAGGCATACAGGGACA -3' (SEQ ID NO:50)
<i>Hes1 murina</i>	directo: 5'- AAAGCCTATCATGGAGAAGAGG -3' (SEQ ID NO:51)
	inverso: 5' – TGCCGGGAGCTATCTTTCTT -3' (SEQ ID NO:52)
<i>Hey2 murina</i>	directo: 5'- GTGGGGAGCGAGAACAATTA -3' (SEQ ID NO:53)
	inverso: 5'- GTTGTCGGTGAATTGGACCT -3' (SEQ ID NO:54)
<i>Gapdh murina</i>	directo: 5'- ATGGTGAAGGTCGGTGTGA -3' (SEQ ID NO:55)
	inverso: 5'- AATCTCCACTTTGCCACTGC -3' (SEQ ID NO:56)

Ensayo de luciferasa

5 Antes del experimento se revistieron placas de 96 pocillos de fondo transparente (CELLSTAR) con fragmentos de J1-ECD (NE3-Fc y NE12-Fc), otros ligandos de Notch (J2 o DLL4; ambos de R&D) o proteína control (mIgG2b) a la concentración de 5 µg/ml en BSA al 0,1%-PBS (incubación durante la noche a 4 °C). Después se cultivaron células de cáncer colorrectal LS174T que expresan el gen de luciferasa bajo el control del cofactor de Notch RbPJ (4 x 10⁴ células/pocillo) en presencia de diferentes mAb (10 µg/ml) o DBZ (100 nM). Después se cuantificó la actividad

luciferasa 24 horas después usando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega).

Ensayo de esferoides

5 Las células se recolectaron y se resuspendieron en medio DMEM completo-Matrigel al 2,5% (BD). La suspensión celular se cultivó sobre placas de 96 pocillos de adherencia baja (Corning) (200 μ l/pocillo) y después se generaron esferoides con un número aproximadamente fijo de células (5 x 10³ células para las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468; 2 x 10³ para las células MCF7) centrifugando las placas a 1800 rpm durante 10 minutos. Al día siguiente se tomaron fotografías de los esferoides (día 1) y se añadieron los tratamientos (los mAb se usaron a 10 μ g/ml [5 μ g/ml para anticuerpos humanizados], mientras que DBZ se usó a la concentración de 100 nM). En algunos experimentos se empleó paclitaxel (1 nM) y doxorubicina (20 nM) en combinación con el tratamiento de mAb J1-65D. Cada 2 días se tomaron fotografías y se reemplazó la mitad del medio por medio fresco que contenía mAb/fármaco. Al final de experimento, los esferoides se lisaron para la extracción del ARN, se procesaron y se introdujeron en parafina para el análisis inmunohistoquímico o se disociaron mediante pipeteado y tripsinización para producir suspensiones de células individuales para el análisis FACS. Se evaluó el tamaño de los esferoides mediante un análisis de imágenes usando el programa ImageJ.

15 *Cuantificación de células madre del cáncer*

Después de la disociación de los esferoides, las células se analizaron para la expresión en la superficie de CD44-CD24 (una combinación de marcadores capaz de identificar una población enriquecida en células madre del cáncer en la línea celular MDA-MB-231 [75]) o para la actividad aldehído deshidrogenasa 1 (una estrategia más general para identificar células madre [76]). Para el análisis de CD44-CD24, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD44 humano conjugado con ficoeritrina (PE) (clon 2C5; R&D Systems) según las directrices del fabricante. Después de lavar, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 1% (en PBS) y se adquirieron con un FACSCalibur. Para la actividad aldehído deshidrogenasa 1, las células se prepararon y se analizaron según el protocolo del fabricante (ALDEFLUOR™ Kit; STEMCELL Technologies).

20 *Experimento de cocultivo de la línea celular estable de J1*

25 Células MDA-MB-231 y U87 transducidas con J1 o con vector se cocultivaron con sus células parentales en una placa de 6 pocillos durante 5 semanas. Las células se dividieron dos veces cada semana y se midieron las poblaciones positivas a GFP (que representan las células transducidas) mediante FACS en cada división.

Experimentos de xenoinjerto

30 Se inyectaron por vía subcutánea células MDA-MB-231 (1 x 10⁷) o líneas celulares estables U87 (1 x 10⁷ transducidas con vector o J1 humana) en 100 μ l de Matrigel en el flanco de ratones BALB/c nu/nu. Se inyectaron al mismo tiempo mAb de bloqueo de J1, mAb de control IgG1, a las concentraciones indicadas, o el mismo volumen de PBS por vía peritoneal como injerto de tumor y cada 3 o 4 días después. Se midieron las dimensiones del tumor y se calculó el volumen tumoral como L x A x H x $\pi/6$ como se ha descrito [77]. Se calculó la media geométrica del diámetro ("Geometric Mean Diameter", GMD) como (L x A x H)^{1/3}.

35 *Humanización y desinmunización de mAb de J1*

Se humanizaron y desinmunizaron mAb de J1 (J1-65D y J1-183D) en Lonza Biologies. Brevemente, se realizó la humanización y la desinmunización por ordenador de ambas secuencias de mAb usando la tecnología de injerto de CDR y la reducción de epítopos de células T. Se sintetizaron los ADNc de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera, y se clonó en vectores de expresión que codifican el marco de IgG1 humana. En total se generaron 40 16 variantes para cada mAb. Se realizó la transfección transitoria en células CHOK1 SV GS-KO y los anticuerpos humanizados se purificaron a partir de 200 ml de sobrenadantes de cultivo a través de una cromatografía de proteína A.

SEQ ID:

SEQ ID NO:1:

45 RASGNIHNYLA

SEQ ID NO:2:

NAKTLADDI

SEQ ID NO:3:

QHFWSAPWT

50 SEQ ID NO:4:

DYEMH

SEQ ID NO:5:

QPGGGGTAYNQKFKG

SEQ ID NO:6:

5 RGYDDYPFAY

SEQ ID NO:7:

KSSQSLNSSNQKNYLA

SEQ ID NO:8:

FASTRESGV

10 SEQ ID NO:9:

QQHYSTPYT

SEQ ID NO:10:

DYAMH

SEQ ID NO:11:

15 NTYYGDASYNQKFKG

SEQ ID NO:12:

LYDYDGGFAY

SEQ ID NO:13:

RTSENIYSYLT

20 SEQ ID NO:14:

NAKILAAGV

SEQ ID NO:15:

QHHYDIPWT

SEQ ID NO:16:

25 DYAIH

SEQ ID NO:17:

NTYYGDSKYNQKFKD

SEQ ID NO:18:

GYDGFAY

30 SEQ ID NO:19:

RASENIYSYLA

SEQ ID NO:20:

NAKTLAEW

SEQ ID NO:21:

35 QHHYGTPLT

SEQ ID NO:22:

DYAMH

SEQ ID NO:23:

NTYYGDARYNQKFKG

SEQ ID NO:24:

5 GLEGFAY

SEQ ID NO:79:

QQHYSTPYT

SEQ ID NO:80:

NAKTLAEGV

10 SEQ ID NO:81:

QHHYGTPWT

Referencias bibliográficas

1. Carmeliet P., Jain R.K., Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature*, 2011, 473(7347):298-307.
- 15 2. Li J.L., Harris A.L., Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications, *Front Biosci.*, 2009, 14:3094-3110.
3. Jain R.K., Duda D.G., Clark J.W., Loeffler J.S., Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2006, 3(1):24-40.
4. Kerbel R.S., Tumor angiogenesis, *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358(19):2039-2049.
- 20 5. Sainson R.C., Harris A.L., Regulation of angiogenesis by homotypic and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies, *Angiogenesis*, 2008, 11(1):41-51.
6. Swiatek P.J., Lindsell C.E., del Amo F.F., Weinmaster G., Gridley T., Notch is essential for postimplantation development in mice, *Genes Dev.*, 1994, 8(6):707-719.
- 25 7. Hrabe de Angelis M., McIntyre J., 2º, Gossler A., Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1, *Nature*, 1997, 386(6626):717-721.
8. Xue Y., Gao X., Lindsell C.E., Norton C.R., Chang B., Hicks C., Gendron-Maguire M., Rand E.B., Weinmaster G., Gridley T., Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1, *Hum. Mol. Genet.*, 1999, 8(5):723-730.
- 30 9. Gale N.W., Domínguez M.G., Noguera I., Pan L., Hughes V., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Adams N.C., Lin H.C., Holash J. *et al.*, Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development, *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.*, 2004, 101(45):15949-15954.
10. Joutel A., Corpechot C., Ducros A., Vahedi K., Chabriat H., Mouton P., Alamowitch S., Domenga V., Cecillion M., Marechal E. *et al.*, Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia, *Nature*, 1996, 383(6602):707-710.
- 35 11. Oda T., Elkahlon A.G., Pike B.L., Okajima K., Krantz I.D., Genin A., Piccoli D.A., Meltzer P.S., Spinner N.B., Collins F.S. *et al.*, Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome, *Nat. Genet.*, 1997, 16(3):235-242.
12. Bray S.J., Notch signalling: a simple pathway becomes complex, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, 7(9):678-689.
- 40 13. Purow B., Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, 727:305-319.
14. Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W., Morris J.P., Silverman L.B., Sánchez-Irizarry C., Blacklow S.C., Look A.T., Aster J.C., Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia, *Science*, 2004, 306(5694):269-271.
15. Fabbri G., Rasi S., Rossi D., Trifonov V., Khiabani H., Ma J., Grunn A., Fangazio M., Capello D., Monti S. *et al.*,

- Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation, *J. Exp. Med.*, 2011, 208(7):1389-1401.
- 5 16. Puente X.S., Pinyol M., Quesada V., Conde L., Ordonez G.R., Villamor N., Escaramis G., Jares P., Bea S., González-Díaz M. *et al.*, Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia, *Nature*, 2011, 475(7354):101-105.
17. Kridel R., Meissner B., Rogic S., Boyle M., Telenius A., Woolcock B., Gunawardana J., Jenkins C., Cochrane C., Ben-Neriah S. *et al.*, Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma, *Blood*, 2012, 119(9):1963-1971.
- 10 18. Lee S.Y., Kumano K., Nakazaki K., Sanada M., Matsumoto A., Yamamoto G., Nannya Y., Suzuki R., Ota S., Ota Y. *et al.*, Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma, *Cancer Sci.*, 2009, 100(5):920-926.
19. Shi W., Harris A.L., Notch signaling in breast cancer and tumor angiogenesis: cross-talk and therapeutic potentials, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2006, 11(1):41-52.
- 15 20. Lobry C., Oh P., Aifantis I., Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think, *J. Exp. Med.*, 2011, 208(10):1931-1935.
21. Ranganathan P., Weaver K.L., Capobianco A.J., Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time, *Nat. Rev. Cancer*, 2011, 11(5):338-351.
- 20 22. Li K., Li Y., Wu W., Gordon W.R., Chang D.W., Lu M., Scoggin S., Fu T., Vien L., Histen G. *et al.*, Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283(12):8046-8054.
23. Wu Y., Cain-Hom C., Choy L., Hagenbeek T.J., de Leon G.P., Chen Y., Finkle D., Venook R., Wu X., Ridgway J. *et al.*, Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors, *Nature*, 2010, 464(7291):1052-1057.
- 25 24. Pellegrinet L., Rodilla V., Liu Z., Chen S., Koch U., Espinosa L., Kaestner K.H., Kopan R., Lewis J., Radtke F., Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells, *Gastroenterology*, 2011, 140(4):1230-1240 e1231-1237.
25. Li J.L., Sainson R.C., Shi W., Leek R., Harrington L.S., Preusser M., Biswas S., Turley H., Heikamp E., Hainfellner J.A. *et al.*, Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth *in vivo*, *Cancer Res.*, 2007, 67(23):11244-11253.
- 30 26. Noguera-Troise I., Daly C., Papadopoulos N.J., Coetzee S., Boland P., Gale N.W., Lin H.C., Yancopoulos G.D., Thurston G., Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis, *Nature*, 2006, 444(7122):1032-1037.
27. Ridgway J., Zhang G., Wu Y., Stawicki S., Liang W.C., Chantry Y., Kowalski J., Watts R.J., Callahan C., Kasman I *et al.*, Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis, *Nature*. 2006, 444(7122):1083-1087.
- 35 28. Schemet J.S., Jiang W., Kumar S.R., Krasnoperov V., Trindade A., Benedito R., Djokovic D., Borges C., Ley E.J., Duarte A. *et al.*, Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion, *Blood*, 2007, 109(11):4753-4760.
29. Harrington L.S., Sainson R.C., Williams C.K., Taylor J.M., Shi W., Li J.L., Harris A.L., Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells, *Microvasc. Res.*, 2008, 75(2):144-154.
- 40 30. Reedijk M., Odorcic S., Chang L., Zhang H., Miller N., McCready D.R., Lockwood G., Egan S.E., High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival, *Cancer Res.*, 2005, 65(18):8530-8537.
- 45 31. Hellstrom M., Phng L.K., Hofmann J.J., Wallgard E., Coultas L., Lindblom P., Alva J., Nilsson A.K., Karlsson L., Gaiano N. *et al.*, Dll4 signalling through Notch 1 regulates formation of tip cells during angiogenesis, *Nature*, 2007, 445(7129):776-780.
32. Limbourg F.P., Takeshita K., Radtke F., Branson R.T., Chin M.T., Liao J.K., Essential role of endothelial Notch 1 in angiogenesis, *Circulation*, 2005, 111(14):1826-1832.
- 50 33. Benjamin L.E., Hemo I., Keshet E., A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF, *Development*, 1998, 125(9):1591-1598.

34. Bergers G., Song S., Meyer-Morse N., Bergsland E., Hanahan D., Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors, *J. Clin. Invest.*, 2003, 111(9):1287-1295.
- 5 35. Erber R., Thurnher A., Katsen A.D., Groth G., Kerger H., Hammes H.P., Menger M.D., Ullrich A., Vajkoczy P., Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms, *FASEB J.*, 2004, 18(2):338-340.
36. High F.A., Lu M.M., Pear W.S., Loomes K.M., Kaestner K.H., Epstein J.A., Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, 105(6):1955-1959.
- 10 37. Msaouel P., Dispenzieri A., Galanis E., Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2009, 11(1):43-53.
38. Anderson B.D., Nakamura T., Russell S.J., Peng K.W., High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus, *Cancer Res.*, 2004, 64(14):4919-4926.
39. McDonald C.J., Erlichman C., Ingle J.N., Rosales G.A., Allen C., Greiner S.M., Harvey M.E., Zollman P.J., Russell S.J., Galanis E., A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 2006, 99(2):177-184.
- 15 40. Studebaker A.W., Kreofsky C.R., Pierson C.R., Russell S.J., Galanis E., Raffel C., Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus, *Neuro. Oncol.*, 2010, 12(10):1034-1042.
41. Nandi S., Ulasov I.V., Rolle C.E., Han Y., Lesniak M.S., A chimeric adenovirus with an Ad 3 fiber knob modification augments glioma virotherapy, *J. Gene Med.*, 2009, 11(11):1005-1011.
- 20 42. Galanis E., Hartmann L.C., Cliby W.A., Long H.J., Peethambaram P.P., Barrette B.A., Kaur J.S., Haluska P.J., Jr., Aderca I., Zollman P.J. *et al.*, Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer, *Cancer Res.*, 2010, 70(3):875-882.
43. Wang Y., Ma L., Wang S., Bao Y., Ni C., Guan N., Zhao J., Fan X., Assessment of CAR- or CD46-dependent adenoviral vector-mediated TRAIL gene therapy in clinical adenocarcinoma lung cancer cells, *Oncology*, 2009, 77(6):366-377.
- 25 44. Msaouel P., Iankov I.D., Allen C., Aderca I., Federspiel M.J., Tindall D.J., Morris J.C., Koutsilieris M., Russell S.J., Galanis E., Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter, *Mol. Ther.*, 2009, 17(12):2041-2048.
45. Le Friec G., Sheppard D., Whiteman P., Karsten C.M., Shamoun S.A., Laing A., Bugeon L., Dallman M.J., Melchionna T., Chillakuri C. *et al.*, The CD46- Jagged1 interaction is critical for human T(H)1 immunity, *Nat. Immunol.*, 2012.
- 30 46. Kolev M., Towner L., Donev R., Complement in cancer and cancer immunotherapy, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2011, 59(6):407-419. 47. Gancz D., Fishelson Z., Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): Problem-oriented research and development, *Mol. Immunol.*, 2009, 46(14):2794-2800.
- 35 48. Varela J.C., Atkinson C., Woolson R., Keane T.E., Tomlinson S., Upregulated expression of complement inhibitory proteins on bladder cancer cells and anti-MUC1 antibody immune selection, *Int. J. Cancer*, 2008, 123(6):1357-1363.
49. Ravindranath N.M., Shuler C., Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas, *J. Oral Pathol. Med.*, 2006, 35(9):560-567.
- 40 50. Ong H.T., Timm M.M., Greipp P.R., Witzig T.E., Dispenzieri A., Russell S.J., Peng K.W., Oncolytic measles virus targets high CD46 expression on multiple myeloma cells, *Exp. Hematol.*, 2006, 34(6):713-720.
51. Lee C.N., Heidbrink J.L., McKinnon K., Bushman V., Olsen H., FitzHugh W., Li A., Van Orden K., He T., Ruben S.M. *et al.*, RNA interference characterization of proteins discovered by proteomic analysis of pancreatic cancer reveals function in cell growth and survival, *Pancreas*, 2012, 41(1):84-94.
- 45 52. Maciejczyk A., Szelachowska J., Szynglarewicz B., Szulc R., Szulc A., Wysocka T., Jagoda E., Lage H., Surowiak P: CD46 Expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2011, 19(6):540-546.
53. Surowiak P., Materna V., Maciejczyk A., Kaplenko I., Spaczynski M., Dietel M., Lage H., Zabel M: CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients, *Anticancer Res.*, 2006, 26(6C):4943-4948.
- 50

54. Cui W., Zhang Y., Hu N., Shan C., Zhang S., Zhang W., Zhang X., Ye L., miRNA-520b and miR-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3'UTR of CD46, *Cancer Biol. Ther.*, 2010, 10(3):232-241.
55. Geis N., Zell S., Rutz R., Li W., Giese T., Mamidi S., Schultz S., Kirschfink M., Inhibition of membrane complement inhibitor expression (CD46, CD55, CD59) by siRNA sensitizes tumor cells to complement attack *in vitro*, *Curr. Cancer Drug Targets*, 2010, 10(8):922-931.
56. Gao L.J., Guo S.Y., Cai Y.Q., Gu P.Q., Su Y.J., Gong H., Liu Y., Chen C., Cooperation of decay-accelerating factor and membrane cofactor protein in regulating survival of human cervical cancer cells, *BMC Cancer*, 2009, 9:384.
57. Zell S., Geis N., Rutz R., Schultz S., Giese T., Kirschfink M., Down-regulation of CD55 and CD46 expression by anti-sense phosphorothioate oligonucleotides (S-ODNs) sensitizes tumour cells to complement attack, *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, 150(3):576-584.
58. Sethi N., Dai X., Winter C.G., Kang Y., Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells, *Cancer Cell*, 2011, 19(2):192-205.
59. Jundt F., Probsting K.S., Anagnostopoulos I., Muehlinghaus G., Chatterjee M., Mathas S., Bargou R.C., Manz R., Stein H., Dorken B: Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells, *Blood*, 2004, 103(9):3511-3515.
60. Perry A.M., Cardesa-Salzmann T.M., Meyer P.N., Colomo L., Smith L.M., Fu K., Greiner T.C., Delabie J., Gascoyne R.D., Rimsza L. *et al.*, A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Blood*, 2012, 120(11):2290-2296.
61. Lenz G., Wright G., Dave S.S., Xiao W., Powell J., Zhao H., Xu W., Tan B., Goldschmidt N., Iqbal J. *et al.*, Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas, *N. Engl. J. Med.*, 2008, 359(22):2313-2323.
62. Cardesa-Salzmann T.M., Colomo L., Gutiérrez G., Chan W.C., Weisenburger D., Climent F., González-Barca E., Mercadal S., Arenillas L., Serrano S. *et al.*, High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy, *Haematologica*, 2011, 96(7):996-1001.
63. Stopeck A.T., Unger J.M., Rimsza L.M., LeBlanc M., Farnsworth B., Iannone M., Glenn M.J., Fisher R.I., Miller T.P., A phase 2 trial of standard-dose cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone (CHOP) and rituximab plus bevacizumab for patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: SWOG 0515, *Blood*, 2012, 120(6):1210-1217.
64. Stopeck A.T., Unger J.M., Rimsza L.M., Bellamy W.T., Iannone M., Persky D.O., Leblanc M., Fisher R.I., Miller T.P., A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: Southwest oncology group study S0108, *Leuk. Lymphoma*, 2009, 50(5):728-735.
65. Cordle J., Johnson S., Tay J.Z., Roversi P., Wilkin M.B., de Madrid B.H., Shimizu H., Jensen S., Whiteman P., Jin B. *et al.*, A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008, 15(8):849-857.
66. Aste-Amezaga M., Zhang N., Lineberger J.E., Arnold B.A., Toner T.J., Gu M., Huang L., Vitelli S., Vo K.T., Haytko P. *et al.*, Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch 1 receptors, *PLoS One*, 2010, 5(2):e9094.
67. Knupfer H., Preiss R., Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review), *Breast cancer research and treatment*, 2007, 102(2):129-135.
68. Korkaya H., Kim G.I., Davis A., Malik F., Henry N.L., Ithimakin S., Quraishi A.A., Tawakkol N., D'Angelo R., Paulson A.K. *et al.*, Activation of an IL6 Inflammatory Loop Mediates Trastuzumab Resistance in HER2+ Breast Cancer by Expanding the Cancer Stem Cell Population, *Molecular Cell*, 2012.
69. Robertson N., Potter C., Harris A.L., Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion, *Cancer research*, 2004, 64(17):6160-6165.
70. Winum J.Y., Scozzafava A., Montero J.L., Supuran C.T., Inhibition of carbonic anhydrase IX: a new strategy against cancer, *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 2009, 9(6):693-702.
71. Kang Y., Massague J., Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis, *Cell*, 2004, 118(3):277-279.
72. Moreno-Bueno G., Portillo F., Cano A., Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer, *Oncogene*, 2008, 27(55):6958-6969.

73. Ocana O.H., Corcoles R., Fabra A., Moreno-Bueno G., Acloque H., Vega S., Barrallo-Gimeno A., Cano A., Nieto M.A., Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1, *Cancer Cell*, 2012, 22(6):709-724.
- 5 74. Cordle J., Redfieldz C., Stacey M., van der Merwe P.A., Willis A.C., Champion B.R., Hambleton S., Handford P.A., Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283(17):11785-11793.
75. Marotta L.L., Almendro V., Marusyk A., Shipitsin M., Schemme J., Walker S.R., Bloushtain-Qimron N., Kim J.J., Choudhury S.A., Maruyama R. *et al.*, The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors, *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(7):2723-2735.
- 10 76. Yu F., Li J., Chen H., Fu J., Ray S., Huang S., Zheng H., Ai W., Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion, *Oncogene*, 2011, 30(18):2161-2172.
77. Tomayko M.M., Reynolds C.P., Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1989, 24(3):148-154.
- 15 78. Al-Lazikani B., Lesk A.M., Chothia C. (1997), Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, 273, 927-948.
79. Kabat *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147(5):1709-1719.
80. Facciabene A., Motz G.T., Coukos G., T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis, *Cancer Research*, 2012, 72(9):2162-2171.
- 20 81. Oleinika K., Nibbs R.J., Graham G.J., Fraser A.R., Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression, *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, 171(1):36-45.
82. Vigouroux S., Yvon E., Wagner H.J., Biagi E., Dotti G., Sili U., Lira C., Rooney C.M., Brenner M.K., Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes, *J. Virol.*, 2003, 77(20):10872-10880.
- 25 83. Asano N., Watanabe T., Kitani A., Fuss I.J., Strober W., Notch1 signaling and regulatory T cell function, *J. Immunol.*, 2008, 180(5):2796-2804.
84. Hue S., Kared H., Mehwish Y., Mouhamad S., Balbo M., Levy Y., Notch activation on effector T cells increases their sensitivity to Treg cell-mediated suppression through upregulation of TGF- β RII expression, *Eur. J. Immunol.*, 2012, 42(7):1796-1803.
- 30 85. Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Grigg A., Arthur C., Taylor K., Herrmann R., Lynch K.P., Hughes T.P., High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance, *Blood*, 2002, 99(9):3472-3475.
- 35 86. Kop E.N., Kwakkenbos M.J., Teske G.J., Kraan M.C., Smeets T.J., Stacey M., Lin H.H., Tak P.P., Hamann J., Identification of the epidermal growth factor-TM7 receptor EMR2 and its ligand dermatan sulfate in rheumatoid synovial tissue, *Arthritis Rheum.*, 2005, 52(2):442-450.
87. Zack *et al.*, *Mol. Immunol.*, 1995, 32(17-18):1345-53.
88. Samaranyake *et al.*, *Ann. Med.*, 2009, 41(5):322-31.
89. Fang *et al.*, *Mol. Ther.*, 2007, 15(6):1153-9.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo que reconoce específicamente un epitopo que comprende una porción del dominio de secuencia Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) de Jagged 1 humana y que bloquea la interacción entre Jagged 1 humana y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en Notch y CD46; en el que dicho dominio DSL de Jagged 1 humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y en el que dicha porción del dominio DSL de Jagged 1 humana comprende el resto E228.
- 2.- Un anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo bloquea la interacción entre Jagged 1 humana y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en Notch 1 humano, Notch 2 humano, Notch 3 humano, Notch 4 humano, Notch 1 de ratón, Notch 2 de ratón, Notch 3 de ratón, Notch 4 de ratón, CD46 humano.
- 3.- Un anticuerpo según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo no reconoce específicamente el ligando 4 similar a Delta humano; preferiblemente, en el que dicho anticuerpo no bloquea la interacción entre el ligando 4 similar a Delta humano y Notch; más preferiblemente, en el que dicho anticuerpo no bloquea la interacción entre el ligando 4 similar a Delta humano y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en Notch 1 humano, Notch 2 humano, Notch 3 humano, Notch 4 humano, Notch 1 de ratón, Notch 2 de ratón, Notch 3 de ratón, Notch 4 de ratón.
- 4.- Un anticuerpo según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo no reconoce específicamente Jagged 2 humana; preferiblemente, en el que dicho anticuerpo no bloquea la interacción entre Jagged 2 humana y Notch; más preferiblemente, en el que dicho anticuerpo no bloquea la interacción entre Jagged 2 y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en Notch 1 humano, Notch 2 humano, Notch 3 humano, Notch 4 humano, Notch 1 de ratón, Notch 2 de ratón, Notch 3 de ratón, Notch 4 de ratón; más preferiblemente, en el que dicho anticuerpo además no bloquea la interacción entre Jagged 1 de ratón y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en Notch y CD46; más preferiblemente, en el que dicho anticuerpo no bloquea la interacción entre Jagged 1 de ratón y cualquier receptor seleccionado del grupo que consiste en Notch 1 humano, Notch 2 humano, Notch 3 humano, Notch 4 humano, Notch 1 de ratón, Notch 2 de ratón, Notch 3 de ratón, Notch 4 de ratón, y CD46 humano.
- 5.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que tienen la secuencia de aminoácidos de:
 SEQ ID NO:1-6, respectivamente, o variantes de SEQ ID NO:1-6, respectivamente, con no más de 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos;
 SEQ ID NO:7-12, respectivamente, o variantes de SEQ ID NO:7-12, respectivamente, con no más de 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos; opcionalmente, en el que dicho anticuerpo comprende además una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79-81, respectivamente, o variantes de SEQ ID NO:79-81, respectivamente, con no más de 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos;
 SEQ ID NO:13-18, respectivamente, o variantes de SEQ ID NO:13-18, respectivamente, con no más de 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos; o
 SEQ ID NO:19-24, respectivamente, o variantes de SEQ ID NO:19-24, respectivamente, con no más de 4 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.
- 6.- Un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que tienen la secuencia de aminoácidos de:
 SEQ ID NO:1, 26 y 3, respectivamente; o
 SEQ ID NO:1, 27 y 3, respectivamente; y
 una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que tienen la secuencia de aminoácidos de:
 SEQ ID NO:4, 5 y 6, respectivamente;
 SEQ ID NO:4, 29 y 6, respectivamente; o
 SEQ ID NO:4, 30 y 6, respectivamente;
 que comprende preferiblemente un dominio variable de cadena ligera (V_L) y un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tienen la secuencia de:
 SEQ ID NO:68 y 73, respectivamente;
 SEQ ID NO:68 y 74, respectivamente;

- SEQ ID NO:68 y 75, respectivamente;
SEQ ID NO:68 y 76, respectivamente;
SEQ ID NO:69 y 73, respectivamente;
SEQ ID NO:69 y 74, respectivamente;
- 5 SEQ ID NO:69 y 75, respectivamente;
SEQ ID NO:69 y 76, respectivamente;
SEQ ID NO:70 y 73, respectivamente;
SEQ ID NO:70 y 74, respectivamente;
SEQ ID NO:70 y 75, respectivamente; o
- 10 SEQ ID NO:70 y 76, respectivamente.
- 7.- Un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que tienen la secuencia de aminoácidos de:
- SEQ ID NO:13, 14 y 15, respectivamente;
SEQ ID NO:13, 31 y 15, respectivamente;
- 15 SEQ ID NO:13, 32 y 15, respectivamente; o
SEQ ID NO:13, 33 y 15, respectivamente; y
una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que tienen la secuencia de aminoácidos de:
- SEQ ID NO:16, 17 y 18, respectivamente; o
SEQ ID NO:16, 34 y 18, respectivamente;
- 20 que comprende preferiblemente un dominio variable de cadena ligera (V_L) y un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tienen la secuencia de:
- SEQ ID NO:58 y 63, respectivamente;
SEQ ID NO:58 y 64, respectivamente;
SEQ ID NO:58 y 65, respectivamente;
- 25 SEQ ID NO:58 y 66, respectivamente;
SEQ ID NO:59 y 63, respectivamente;
SEQ ID NO:59 y 64, respectivamente;
SEQ ID NO:59 y 65, respectivamente;
SEQ ID NO:59 y 66, respectivamente;
- 30 SEQ ID NO:60 y 63, respectivamente;
SEQ ID NO:60 y 64, respectivamente;
SEQ ID NO:60 y 65, respectivamente;
SEQ ID NO:60 y 66, respectivamente;
SEQ ID NO:61 y 63, respectivamente;
- 35 SEQ ID NO:61 y 64, respectivamente;
SEQ ID NO:61 y 65, respectivamente; o
SEQ ID NO:61 y 66, respectivamente.

- 8.- Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y un diluyente, excipiente, adyuvante farmacéuticamente aceptables y/o al menos un agente terapéutico adicional.
- 9.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una composición farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en terapia.
- 5 10.- Un anticuerpo o una composición para su uso según la reivindicación 9, en el que dicha terapia es una terapia de combinación, que preferiblemente comprende la administración de un anticuerpo, o una composición farmacéutica según la reivindicación 9, y la administración de al menos un agente quimioterapéutico, radioterapia, al menos un anticuerpo adicional y/o al menos una citoquina.
- 10 11.- Un anticuerpo o una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, para el tratamiento de un tumor/cáncer; preferiblemente, en el que el tumor/cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pancreático, leucemia linfocítica crónica de células B, carcinoma de células escamosas de la lengua, glioma, cáncer renal, leucemia aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer endometrial, cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer gástrico, ameloblastoma, adenocarcinoma esofágico de Barrett, cáncer de pulmón, meduloblastoma, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma difuso de células B grandes, trastornos linfoproliferativos de CD30⁺ cutáneos primarios, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma hepatocelular, tumores/cánceres que comprenden células madre del cáncer.
- 15 12.- Un hibridoma que comprende y/o que segrega un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 20 13.- Una célula o una línea celular que expresa un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en forma recombinante.
- 14.- Un vector de expresión recombinante, capaz de expresar un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

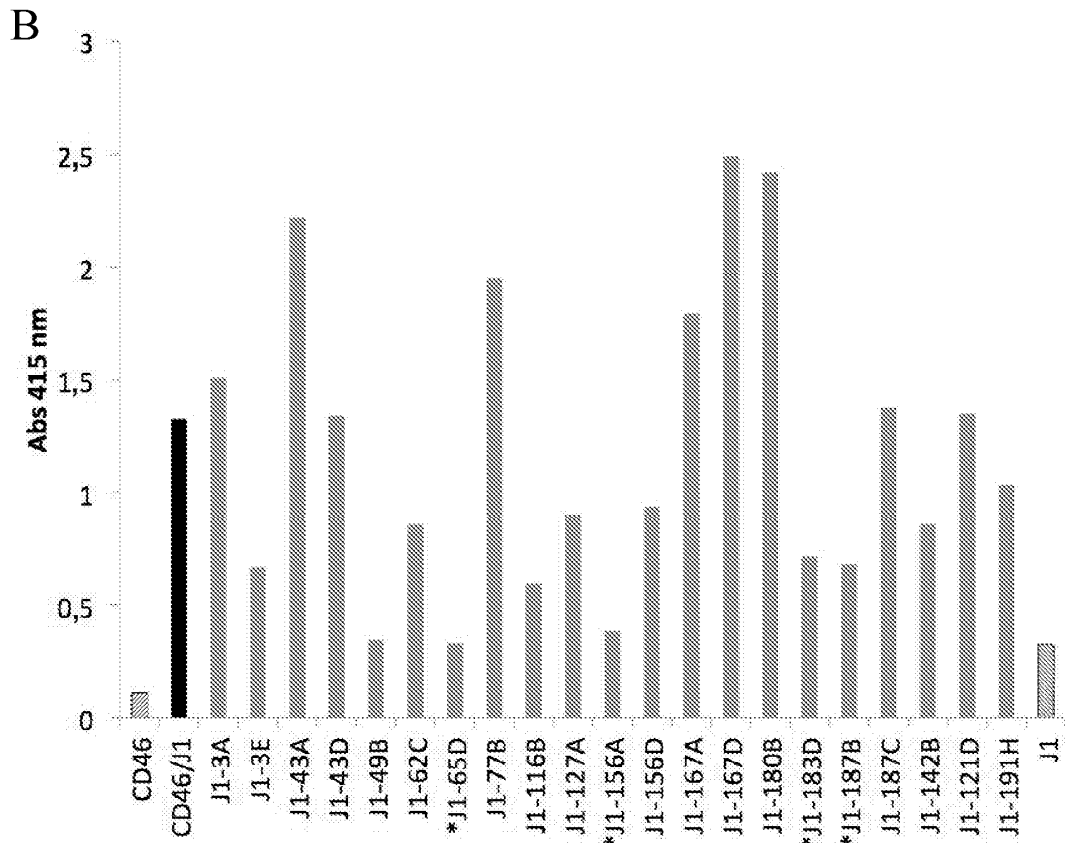
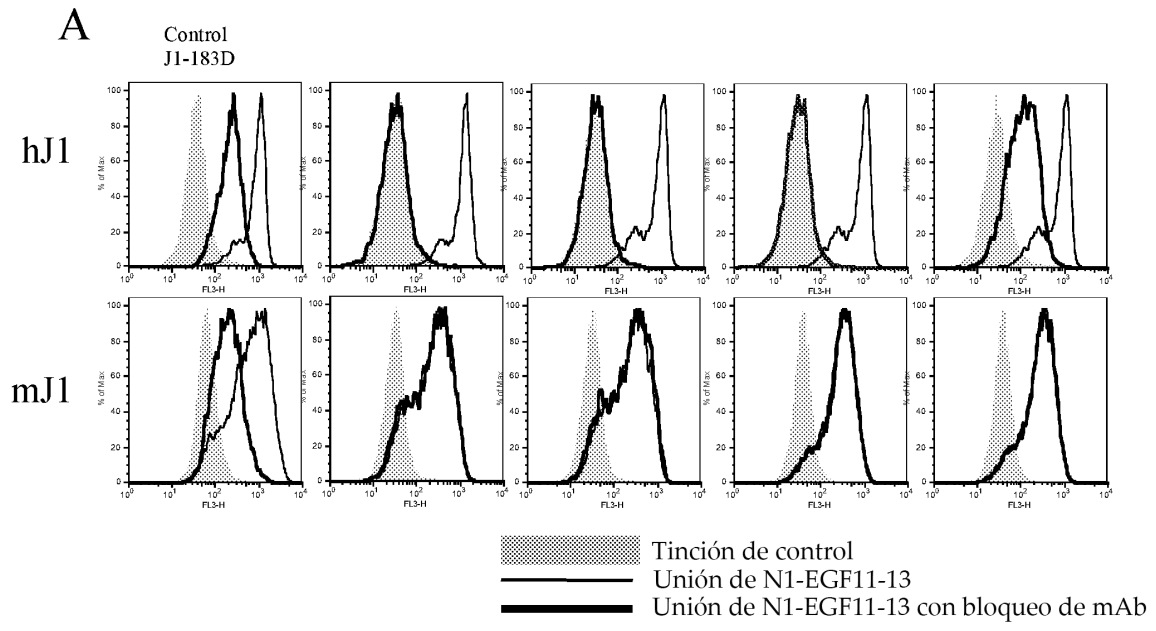


Figura 1

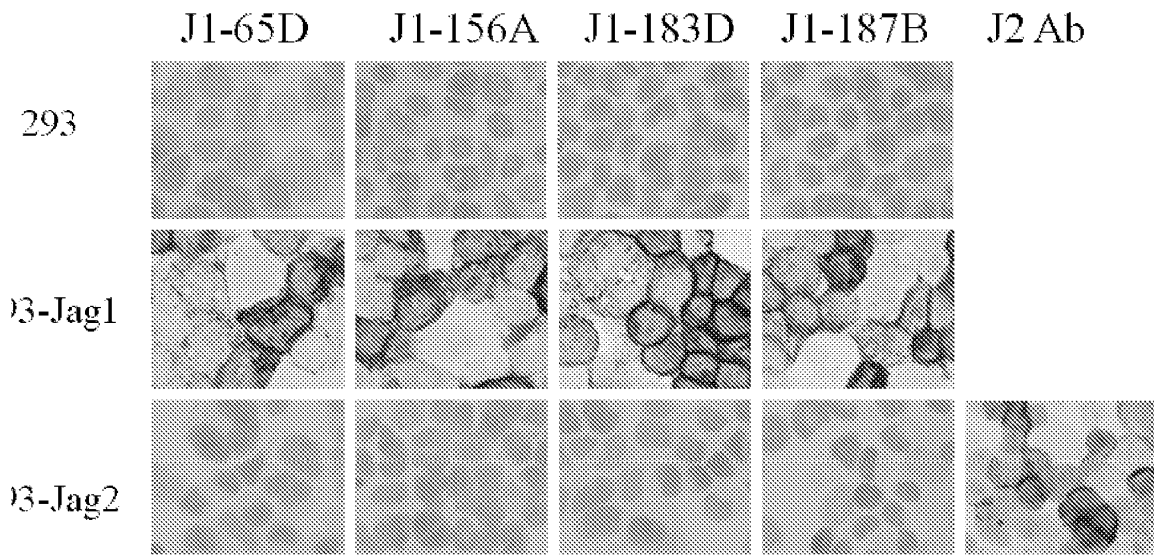


Figura 2

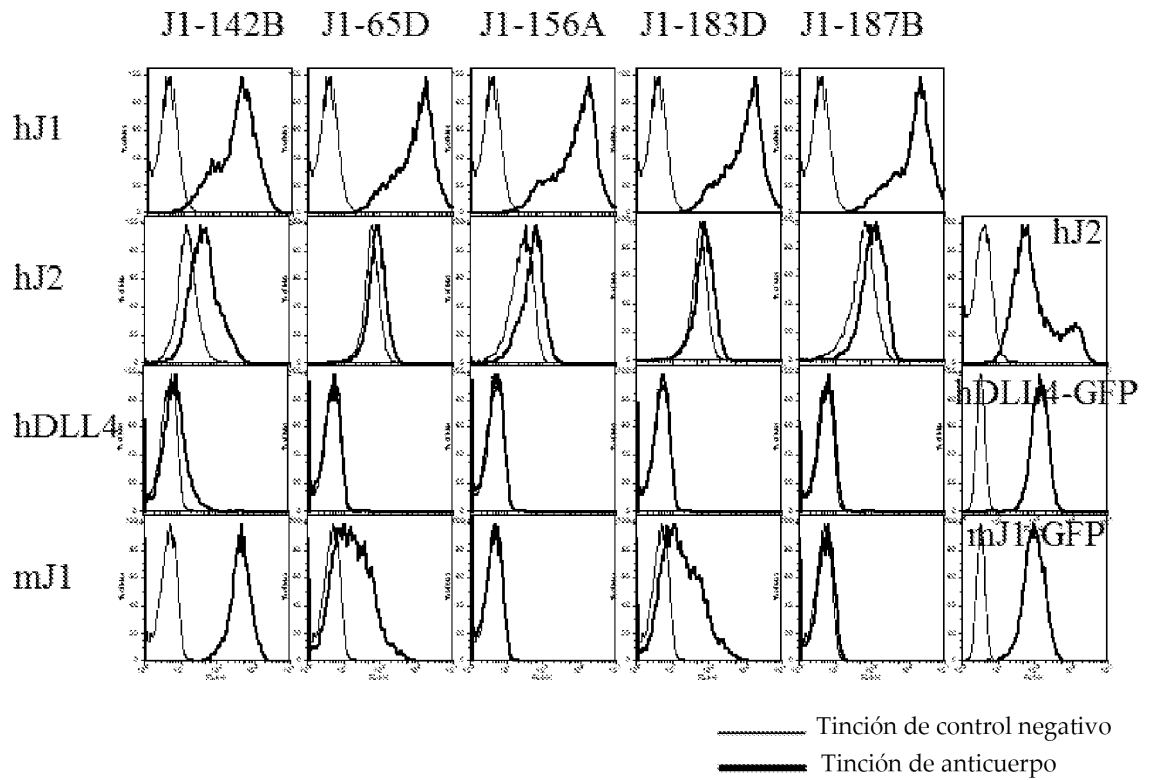


Figura 3

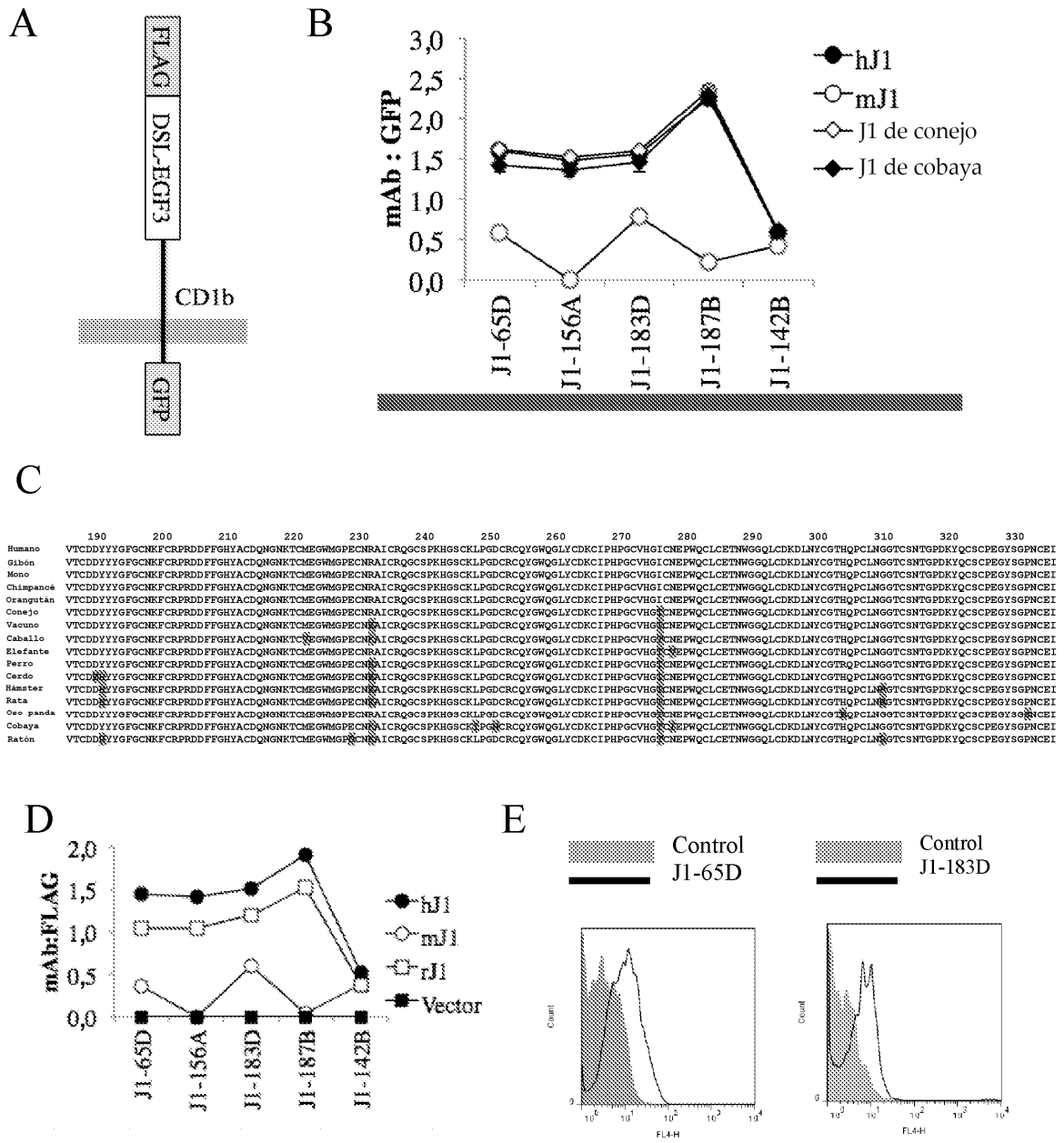


Figura 4

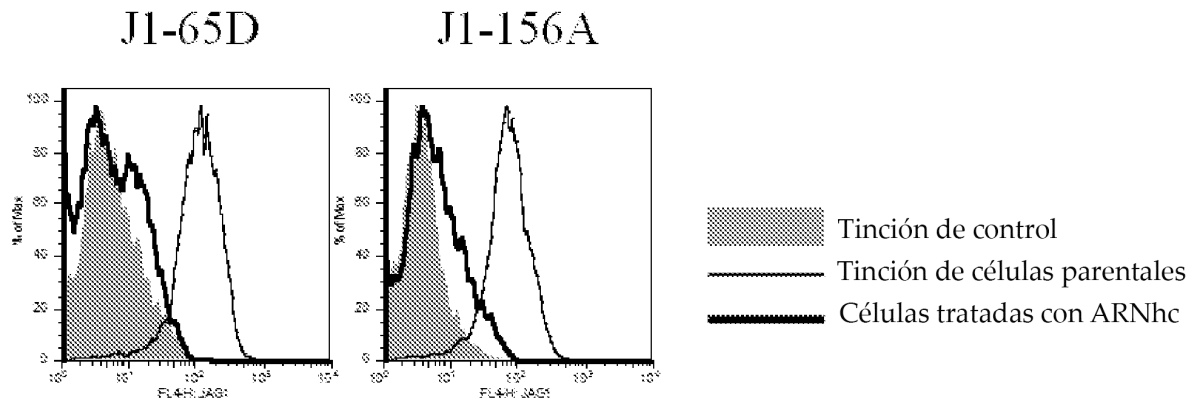


Figura 5

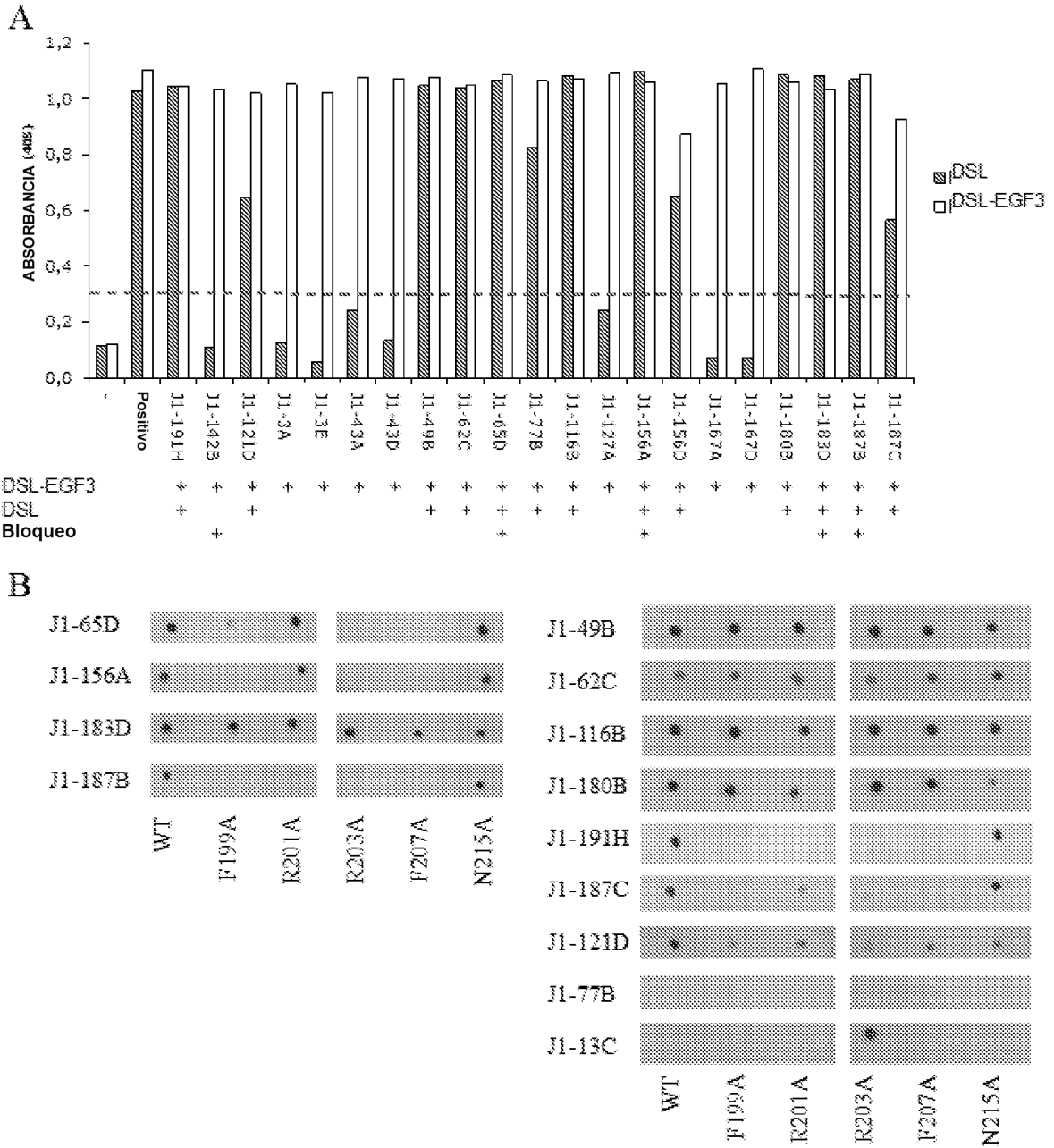


Figura 6

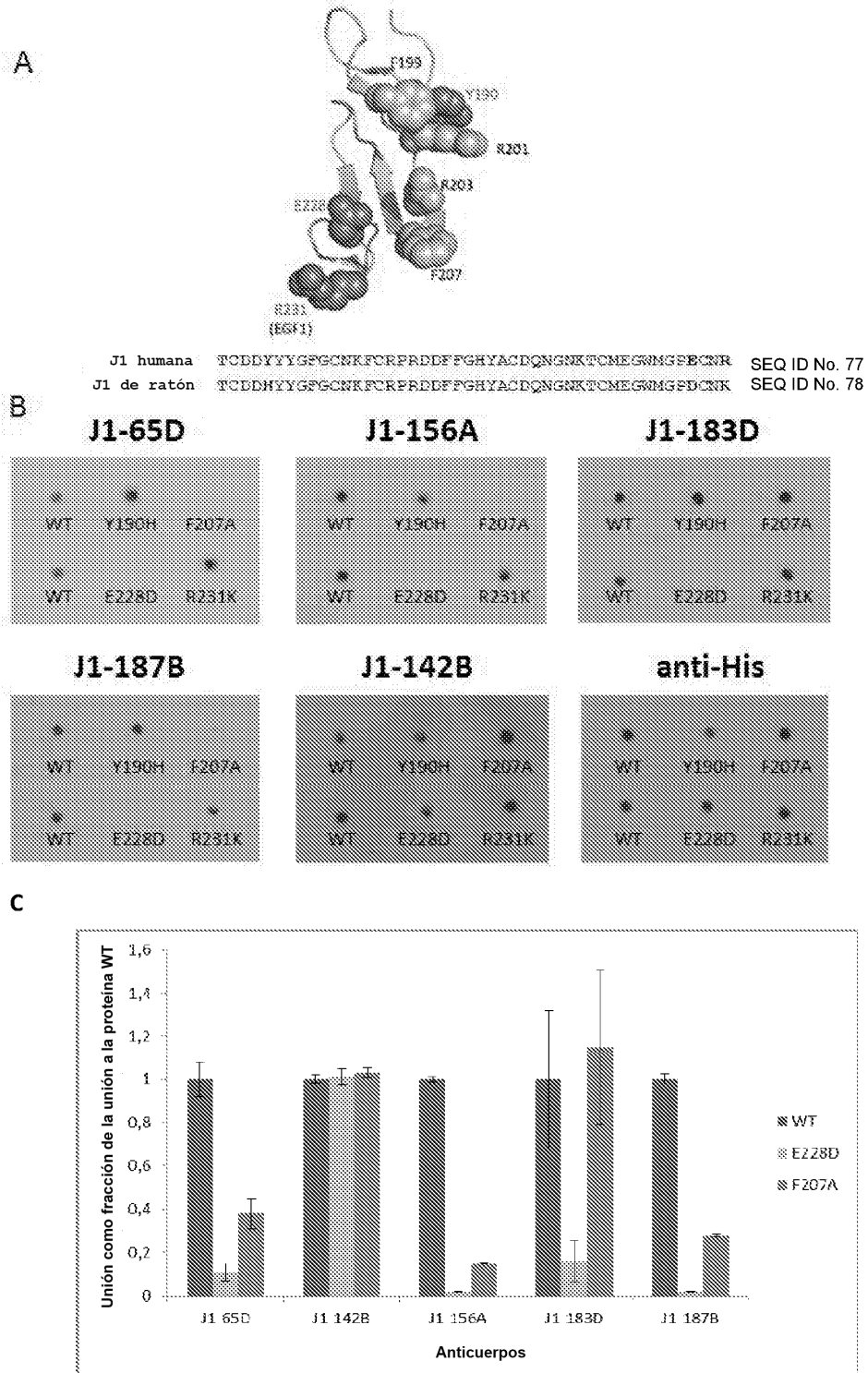


Figura 7

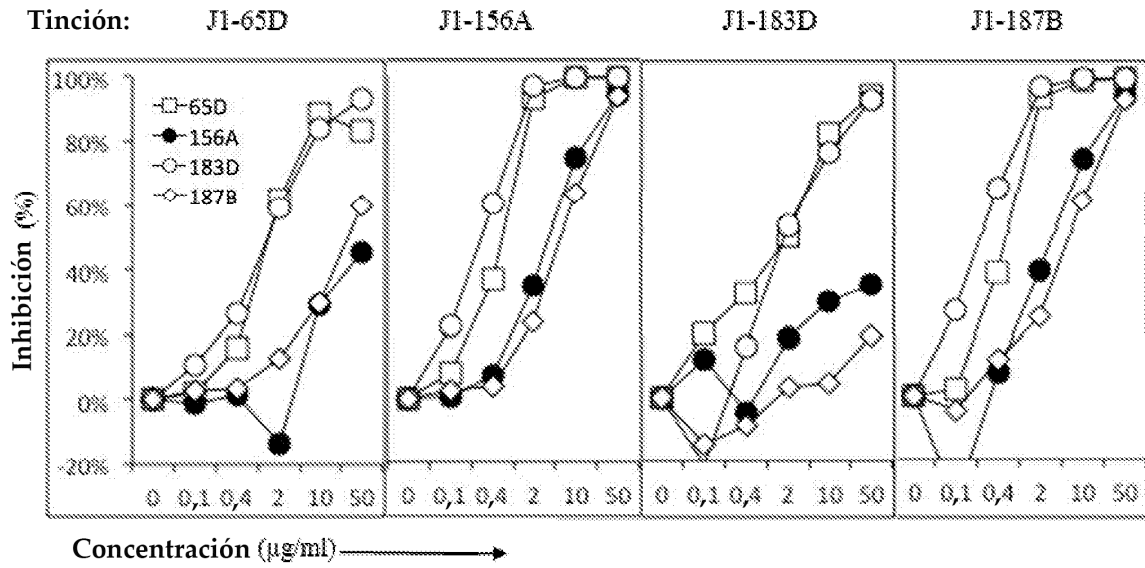


Figura 8

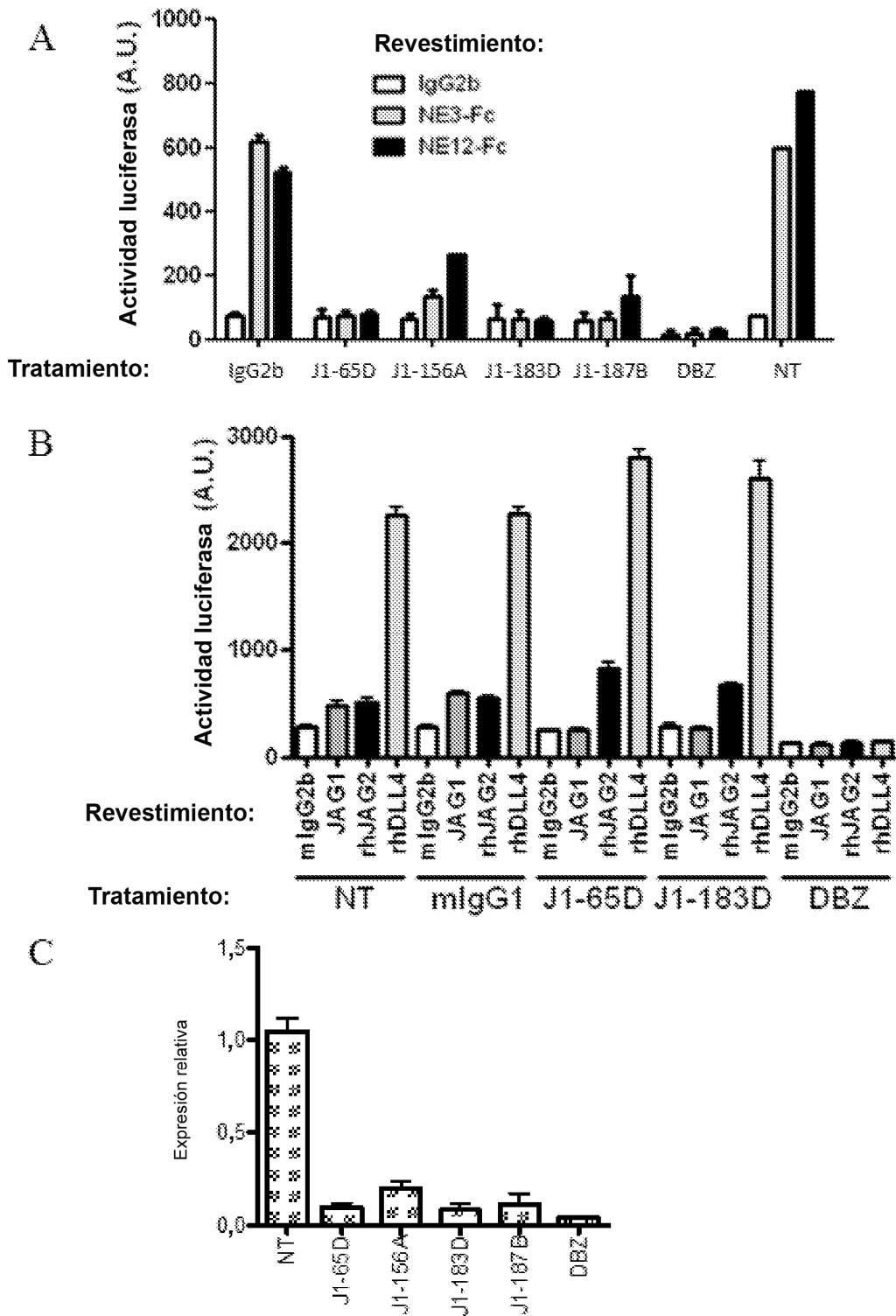
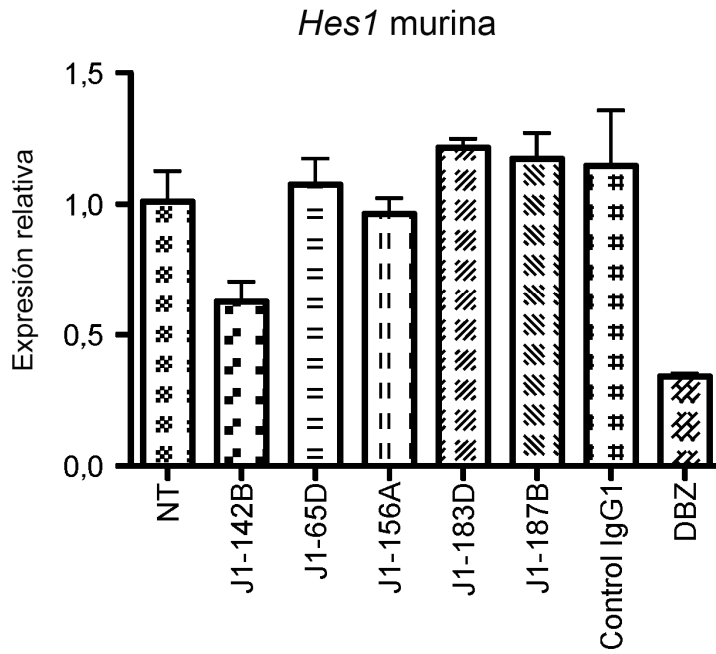


Figura 9

A



B

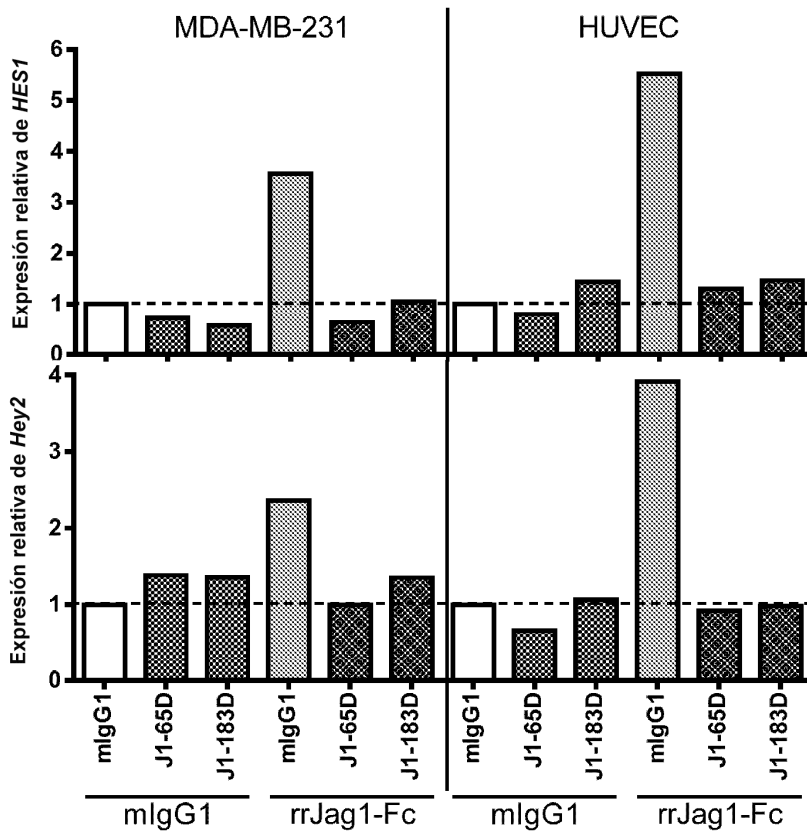


Figura 10

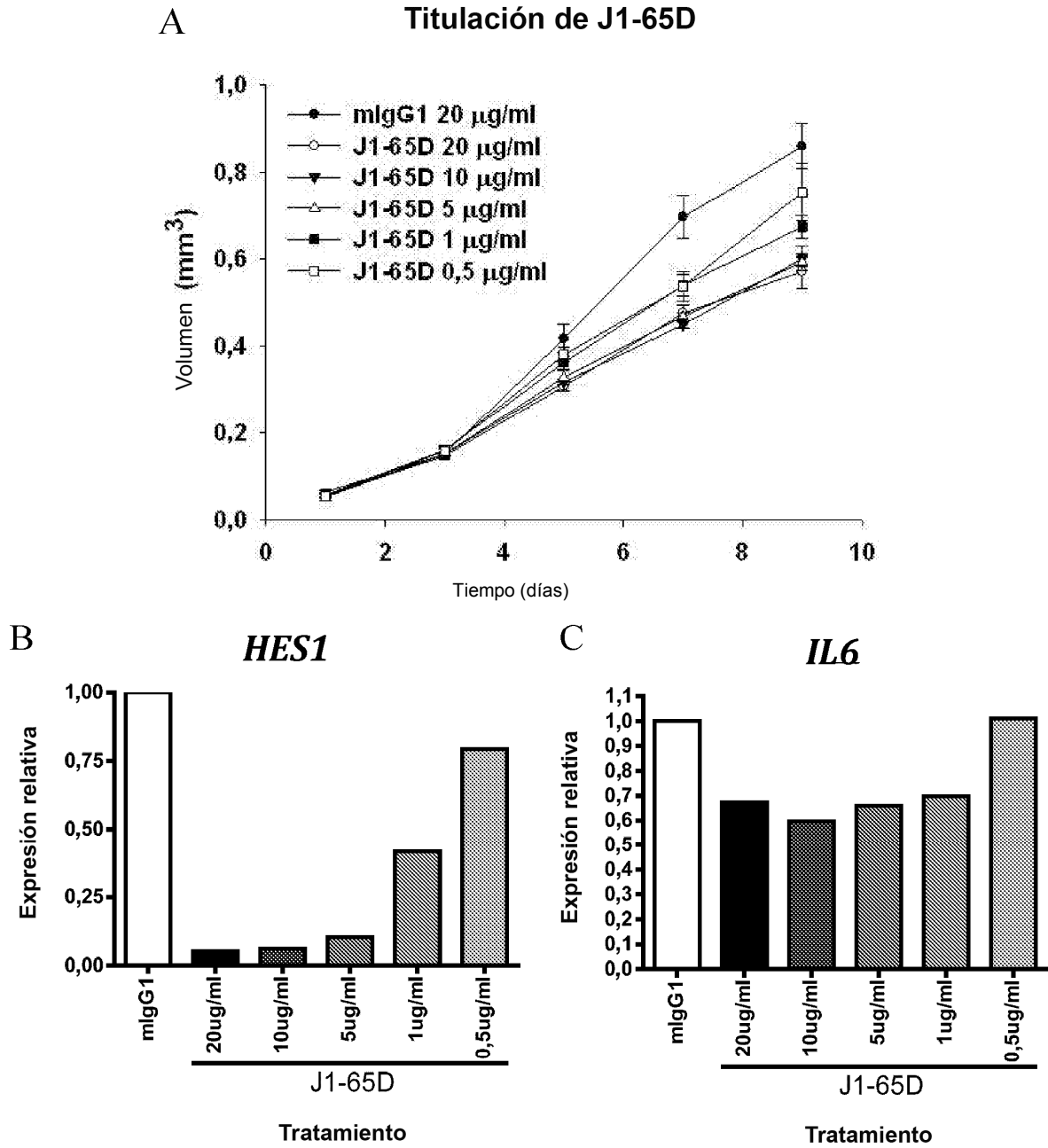


Figura 11

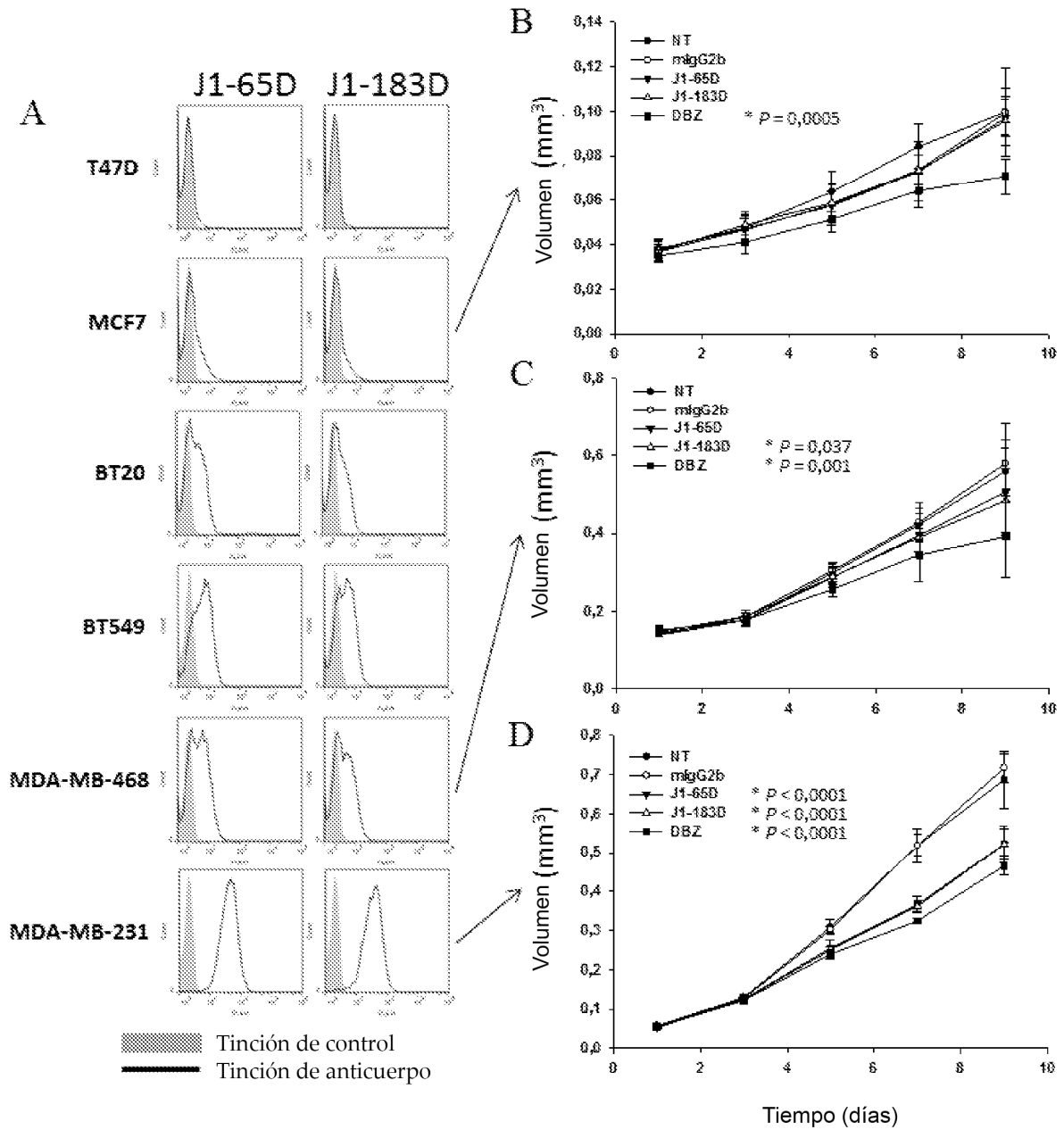


Figura 12

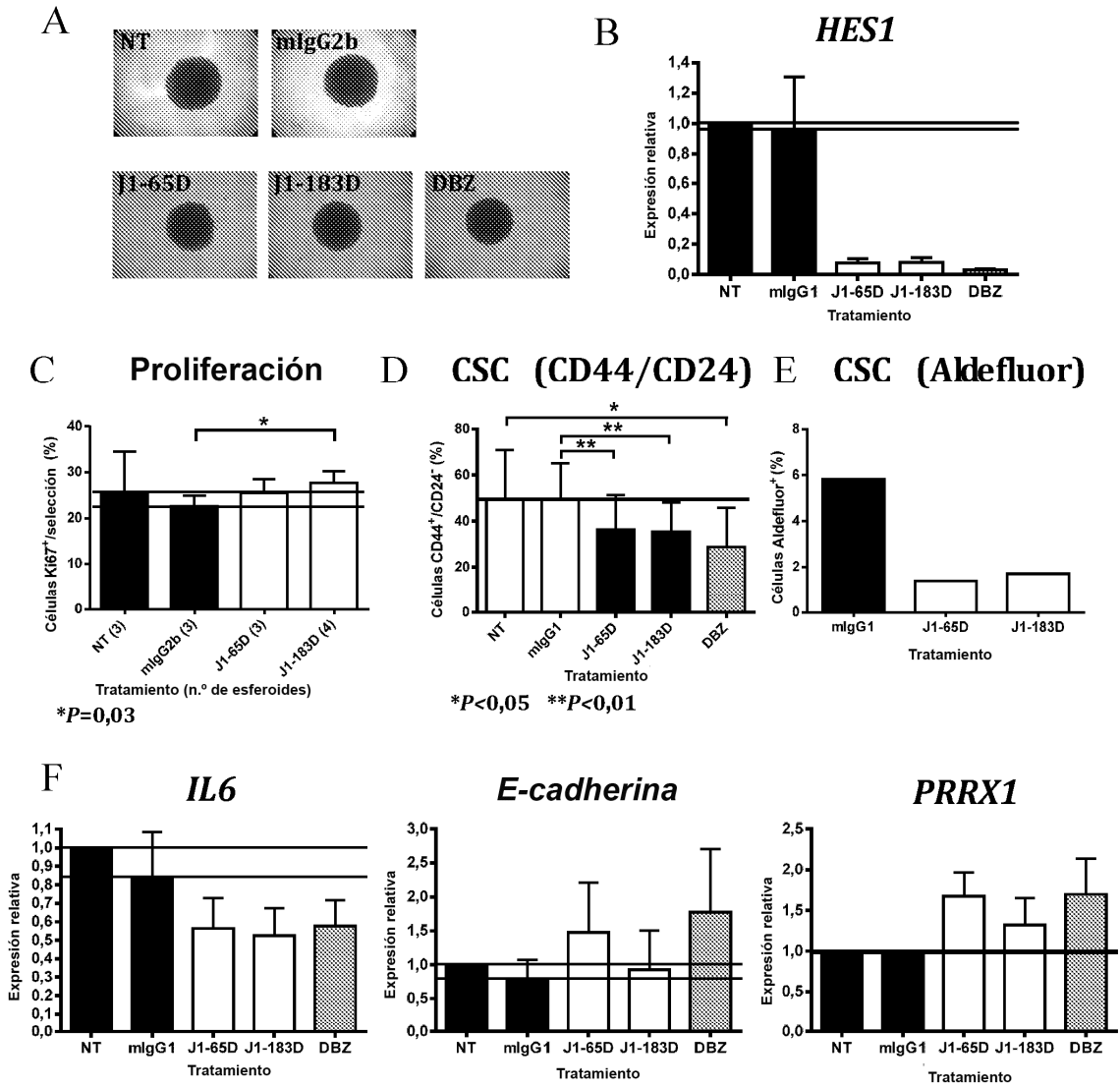


Figura 13

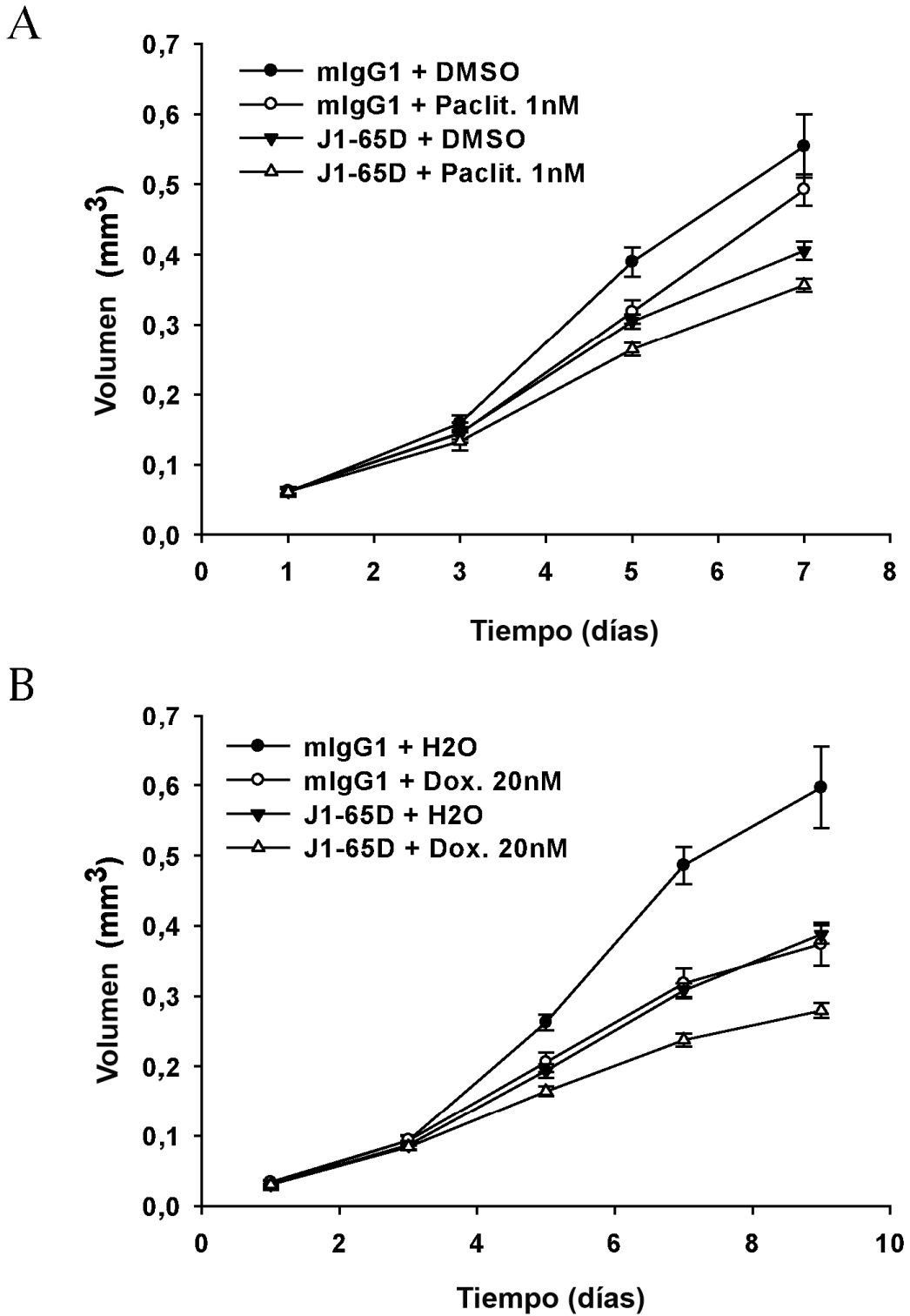
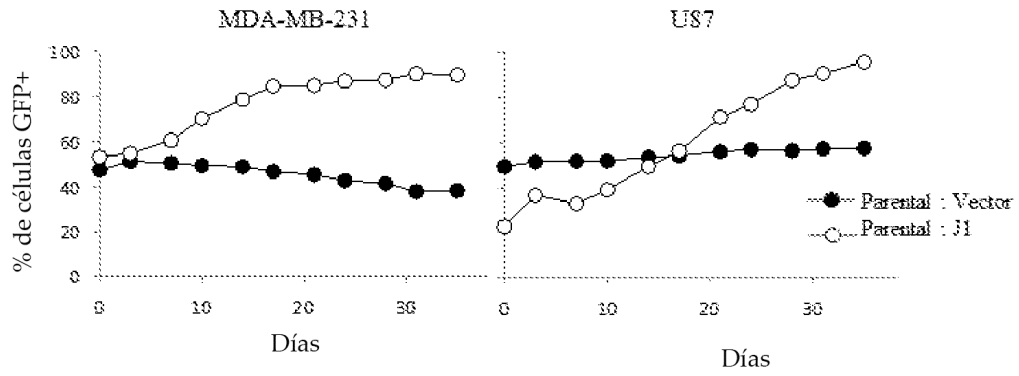


Figura 14

A



B

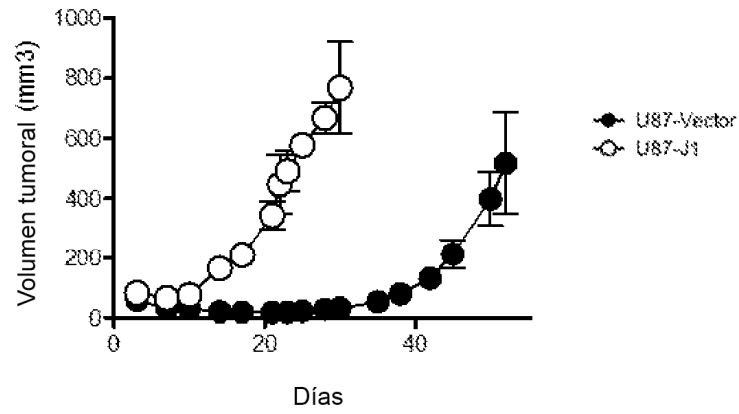
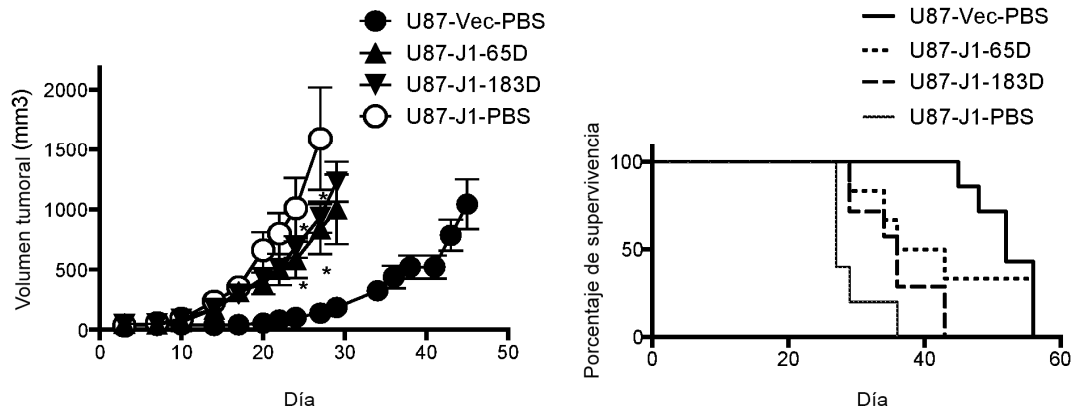


Figura 15

A



B

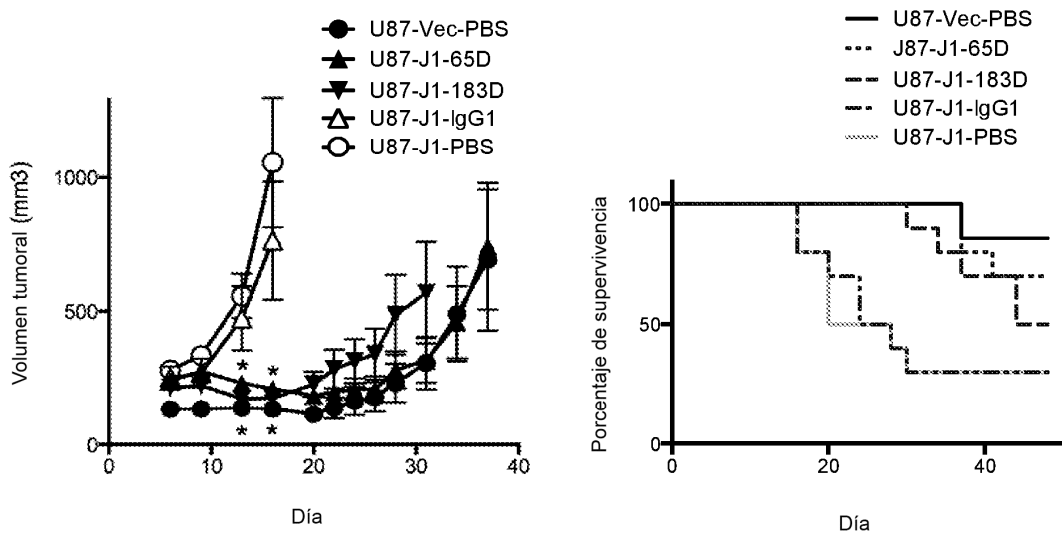


Figura 16

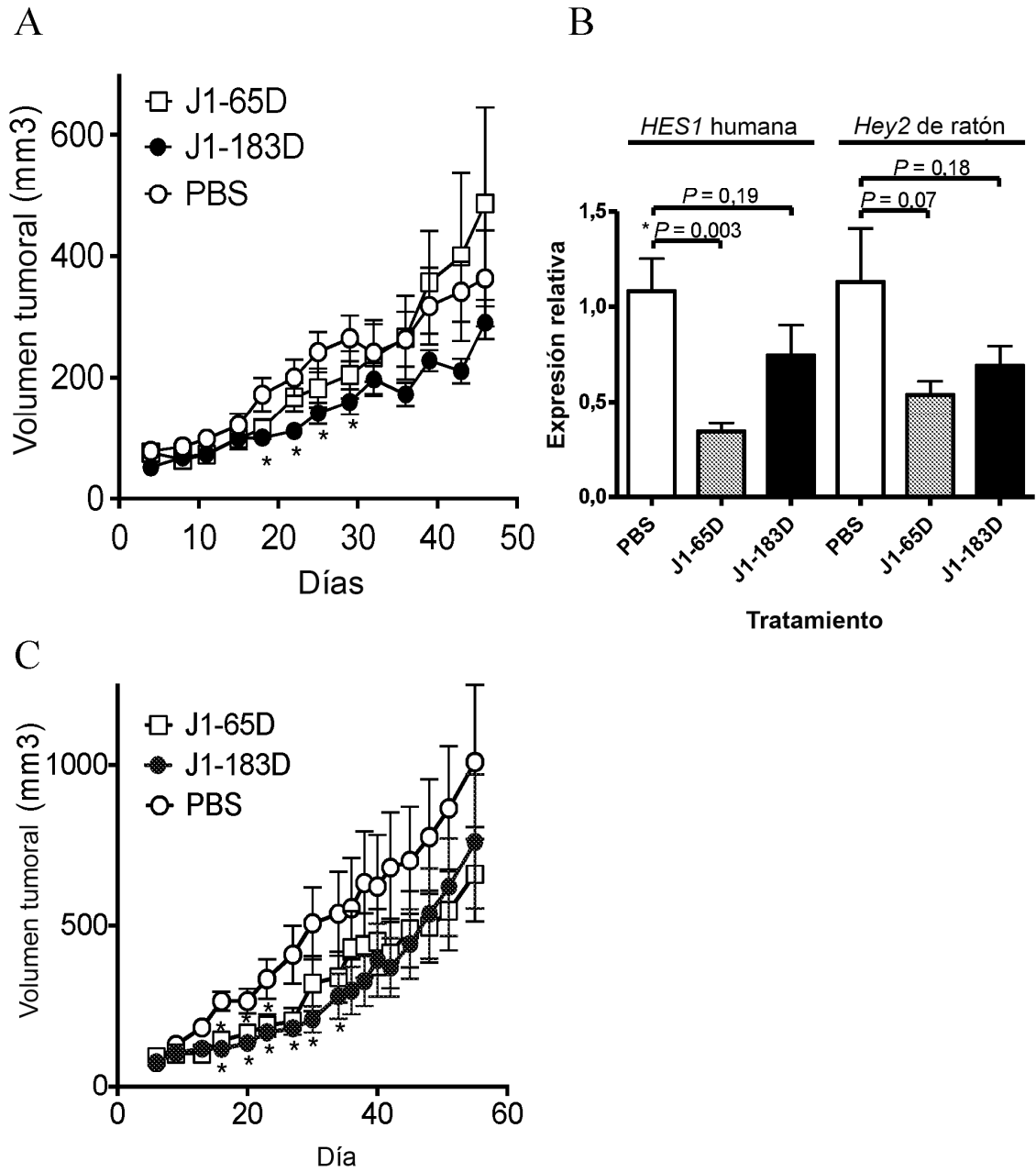


Figura 17

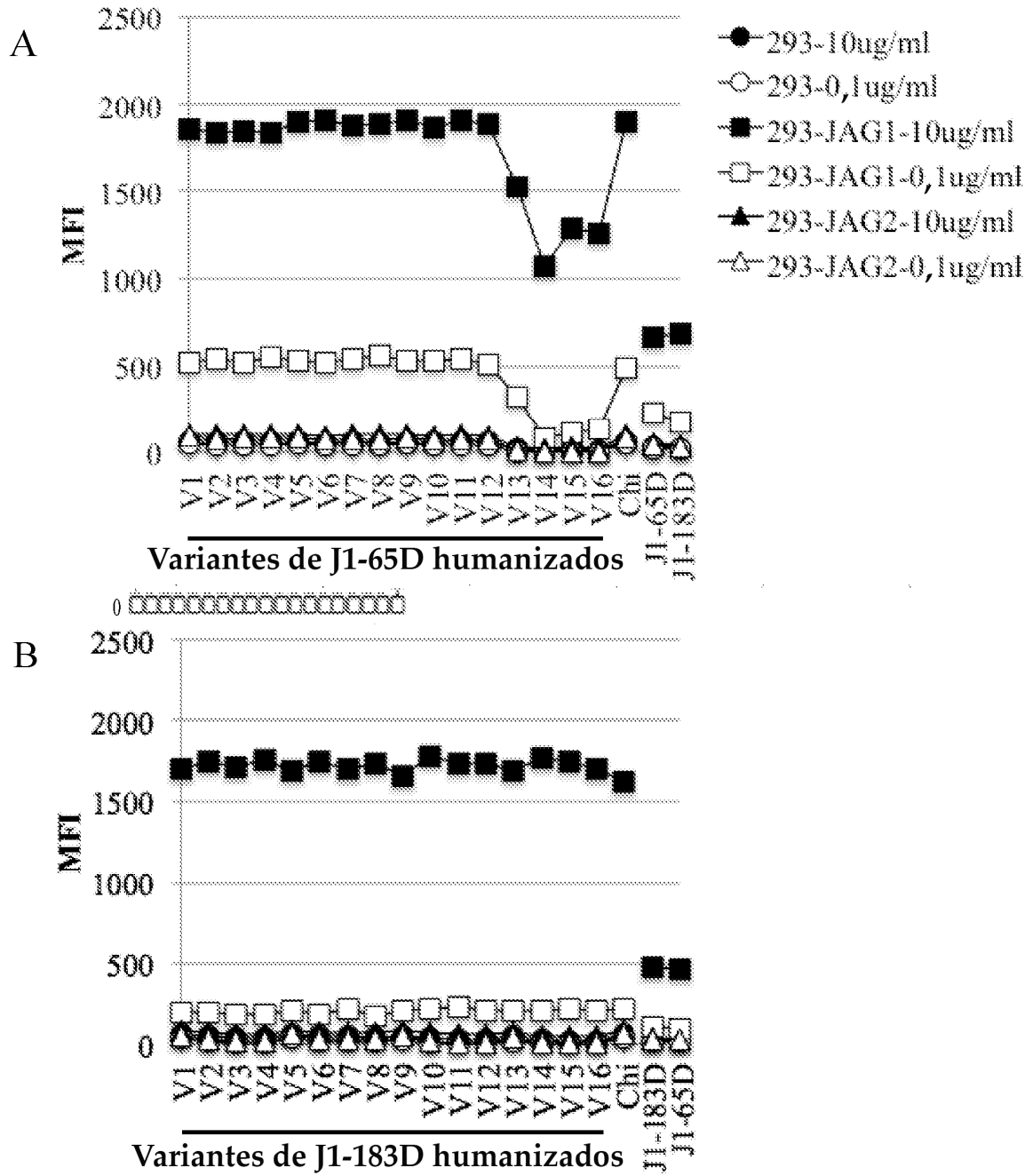


Figura 18

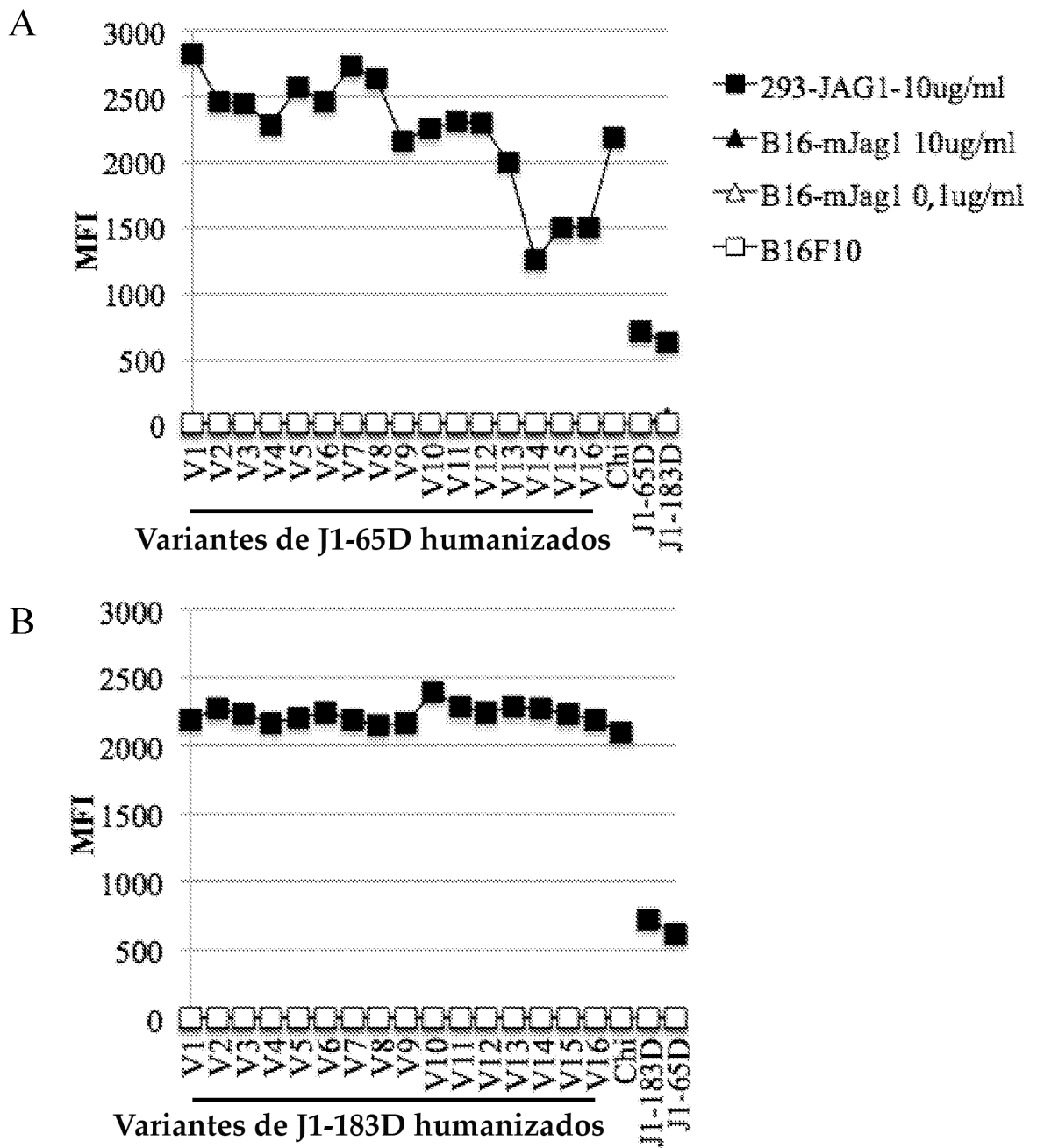


Figura 19

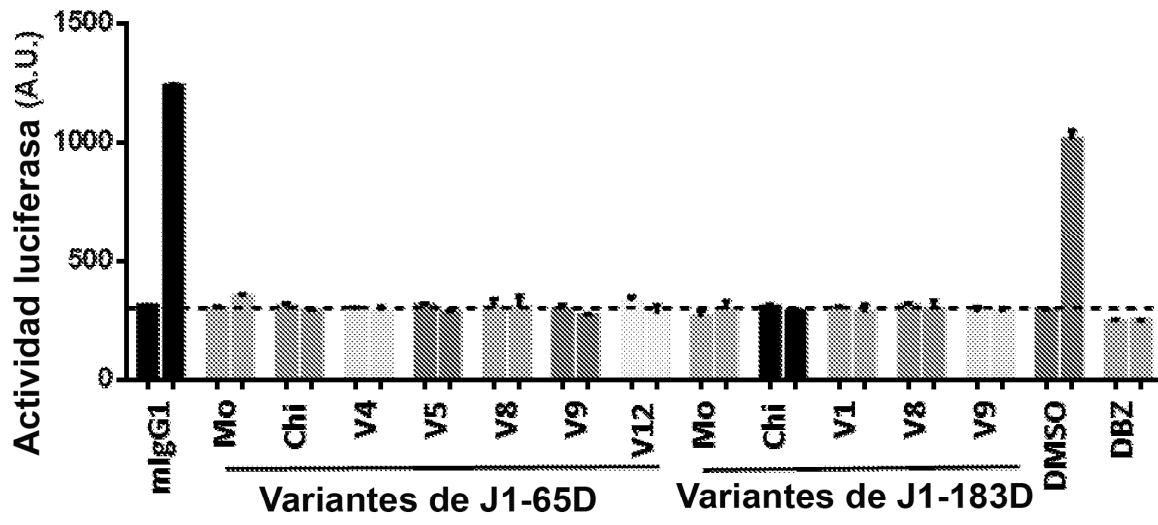
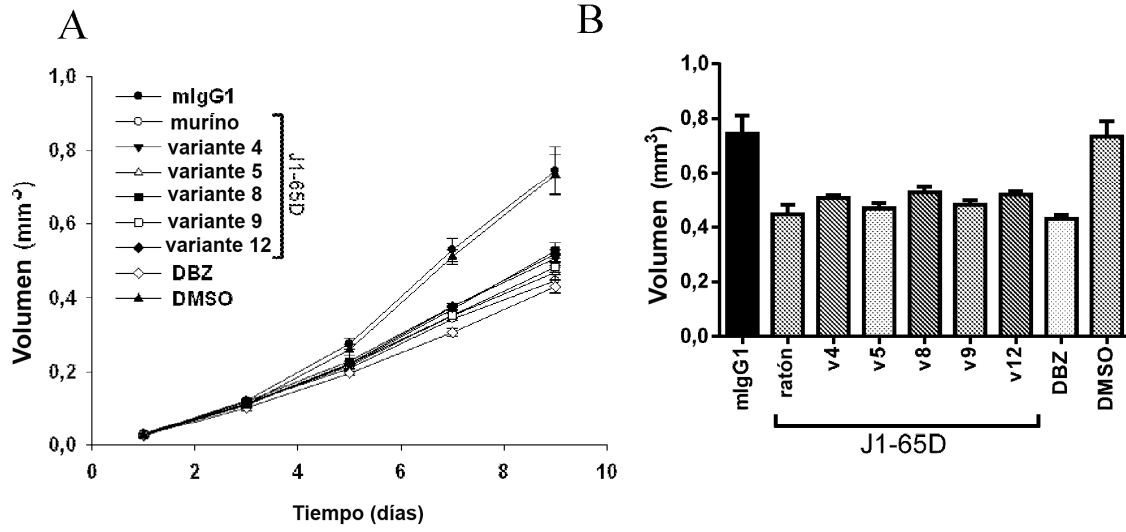


Figura 20

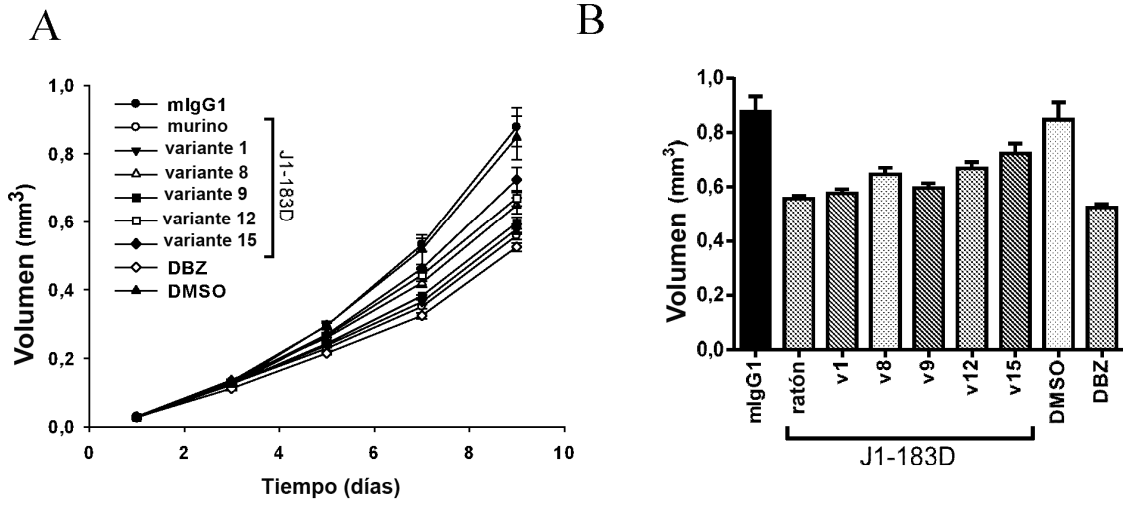


C

	mlgG1	ratón	V4	V5	V8	V9	V12
mlgG1	-	****	****	****	****	****	****
ratón	****	-	**	ns	***	*	***
V4	****	**	-	**	ns	*	ns
V5	****	ns	**	-	***	ns	***
V8	****	***	ns	***	-	**	ns
V9	****	*	*	ns	**	-	**
V12	****	***	ns	***	ns	**	-

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$
 DBZ vs DMSO *** $P < 0,001$, ns = no significativo

Figura 21



C

	mlgG1	ratón	V1	V8	V9	V12	V15
mlgG1	-	****	****	****	****	****	***
ratón	****	-	*	****	***	****	****
V1	****	*	-	***	ns	****	****
V8	****	****	***	-	**	ns	**
V9	****	***	ns	**	-	***	****
V12	****	****	****	ns	***	-	*
V15	***	****	****	**	****	*	-

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$
 DBZ vs DMSO *** $P < 0,001$, ns = no significativo

Figura 22

Secuencias de CDR de J1-183D

	CDR1	CDR2	CDR3
VL de tipo salvaje	RTSENIYSYLT	NAKILAAGV	QHHDIPWT
VL1	RTSENIYSYLT	NAKILAAGV	QHHDIPWT
VL2	RTSENIYSYLT	NAKILASGV	QHHDIPWT
VL3	RTSENIYSYLT	NAKILDSGV	QHHDIPWT
VL4	RTSENIYSYLT	HAKILDSGV	QHHDIPWT
VH de tipo salvaje	DYAIH	NTYYGDSKYNQKFKD	GYDGFAY
VH1	DYAIH	NTYYGDSKYNQKFKD	GYDGFAY
VH2	DYAIH	NTYYGDSKYAQKFOG	GYDGFAY
VH3	DYAIH	NTYYGDSKYAQKFOG	GYDGFAY
VH4	DYAIH	NTYYGDSKYAQKFOG	GYDGFAY

Secuencias de la cadena ligera

J1-183D_VL

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQLTQSPASLSASVGETVFTFCRTSENIYSYLTWYQQKQKSPQ
LLVYN**AKILAAGV**PSRFSGSGSGT**QFSLK**INSLQPEDFGTYTCQHHDIPWTFGGGKLEIKRT
(SEQ ID NO.57)

J1-183D_VL_1

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC**RTSENIYSYLTWYQQKPGKAPKL**
LVYN**AKILAAGV**PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHDIPWTFGGGKLEIKRT (SEQ
ID NO.58)

J1-183D_VL_2

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC**RTSENIYSYLTWYQQKPGKAPKL**
LIYN**AKTLASGV**PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHDIPWTFGGGKLEIKRT (SEQ
ID NO.59)

J1-183D_VL_3

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC**RTSENIYSYLTWYQQKPGKAPKL**
LIYN**AKILDSGV**PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHDIPWTFGGGKLEIKRT (SEQ
ID NO.60)

J1-183D_VL_4

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC**RTSENIYSYLTWYQQKPGKAPKL**
LIY**HAKILDSGV**PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHDIPWTFGGGKLEIKRT (SEQ
ID NO.61)

Secuencias de la cadena pesada

J1-183D_VH

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQL**QQPGTELVR**PGVSVKISCKVSGYAFTDYAIHWIMQ**SHAKSLE**
WIGIINTYYGDSKYNQK**FKDKAT**MTVDKSSNTAYMELARL**TSEDS**AIYYCARGYDGFAYWGQGL
VTVSSASTKGP (SEQ ID NO.62)

J1-183D_VH_1

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAELK**KPGASV**KVSVCKVSGYAFTDYAIHWIRQAPGQGL
EWMGIINTYYGDSKYNQK**FKDR**VMTVDKSTSTAYMELSSLRSED**TAVYYCARGYDGFAYWGQGL**
TLVTVSSASTKGP (SEQ ID NO.63)

J1-183D_VH_2

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAELK**KPGASV**KVSVCKVSGYAFTDYAIHWIRQAPGQGL
EWMGIINTYYGDSKY**AQKFOGR**VMTVDTSTSTAYMELSSLRSED**TAVYYCARGYDGFAYWGQGL**
TLVTVSSASTKGP (SEQ ID NO.64)

J1-183D_VH_3

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAELK**KPGASV**KVSVCKVSGYAFTDYAIHWIRQAPGQGL
EWMGIINTYYGDSKY**AQKFOGR**VMTVDTSTSTAYMELSSLRSED**TAVYYCARGYDGFAYWGQGL**
TLVTVSSASTKGP (SEQ ID NO.65)

J1-183D_VH_4

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAEV**KPGASV**KVSVCKASGYFTDYAIHWIRQAPGQGL
LEWWMGIINTYYGDSKY**AQKFOGR**VMTVDTSTSTAYMELSSLRSED**TAVYYCARGYDGFAYWGQGL**
TLVTVSSASTKGP (SEQ ID NO.66)

Figura 23

Secuencias de CDR de J1-65D

	CDR1	CDR2	CDR3
VL de tipo salvaje	RASGNIHNYLA	NAKTLADDI	QHFWSAPWT
VL1	RASGNIHNYLA	NAKTLADDV	QHFWSAPWT
VL2	RASGNIHNYLA	NAKTLADAV	QHFWSAPWT
VL3	RASGNIHNYLA	NAKTLADAV	QHFWSAPWT
VL4 NB no funcional	RASQGIHNYLA	NAKTLADAV	QQFWSAPWT
VH de tipo salvaje	DYEMH	QPGGGGTAYNQKFKG	RGYDDYPFAY
VH1	DYEMH	QPGGGGTAYNQKFKG	RGYDDYPFAY
VH2	DYEMH	QPGGGGTAYAQKFKG	RGYDDYPFAY
VH3	DYEMH	QPGGGGTAYAQKFOG	RGYDDYPFAY
VH4	DYEMH	QPGGGGTAYAQKFOG	RGYDDYPFAY

Secuencias de la cadena ligera

J1-65D_VL

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVY
NAKTLADDIIPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFSGSYCCQHFWSAPWTFGGGKLEIKRT (SEQ ID
NO.67)

J1-65D_VL_1

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLIY
NAKTLADDVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQHFWSAPWTFGGGKLEIKRT (SEQ ID
NO.68)

J1-65D_VL_2

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLIY
NAKTLADAVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQHFWSAPWTFGGGKLEIKRT (SEQ ID
NO.69)

J1-65D_VL_3

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLIY
NAKTLADAVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQHFWSAPWTFGGGKLEIKRT (SEQ ID
NO.70)

J1-65D_VL_4

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIHNYLAWYQQKPGKAPKLLIY
NAKTLADAVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQFWSAPWTFGGGKLEIKRT (SEQ ID
NO.71)

Secuencias de la cadena pesada

J1-65D_VH

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVKETPVHGLEW
GAIQPGGGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRGRGYDDYPFAYWGQGLV
TVSSASTKGP (SEQ ID NO.72)

J1-65D_VH_1

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAELKPKGSSVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW
MGAIQPGGGGTAYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGRGYDDYPFAYWGQGLT
TVSSASTKGP (SEQ ID NO.73)

J1-65D_VH_2

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAELKPKGSSVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW
MGAIQPGGGGTAYAQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGRGYDDYPFAYWGQGLT
TVSSASTKGP (SEQ ID NO.74)

J1-65D_VH_3

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW
MGAIQPGGGGTAYAQKFOGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGRGYDDYPFAYWGQGLT
TVSSASTKGP (SEQ ID NO.75)

J1-65D_VH_4

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW
MGAIQPGGGGTAYAQKFOGRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGRGYDDYPFAYWGQGLT
TVSSASTKGP (SEQ ID NO.76)

Figura 24