

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 726**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09793181 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2334331**

54 Título: **Anticuerpos anti-Notch2 y métodos de uso**

30 Prioridad:

**01.10.2008 US 101917 P**

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

**23.07.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**SIEBEL, CHRISTIAN W. y  
WU, YAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 541 726 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 anti-Notch2 y métodos de uso

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-Notch, incluyendo anticuerpos anti-región reguladora negativa de Notch2 (NRR), y a usos de los mismos. También se proporcionan anticuerpos anti-Notch1 NRR y métodos de uso.

10

## ANTECEDENTES

La familia de receptor Notch es una clase de receptores transmembrana conservados evolutivamente que transmiten señales que afectan al desarrollo en organismos tan diversos como erizos de mar y seres humanos. Los receptores Notch y sus ligandos, Delta y Serrate (conocidos como Jagged en mamíferos), son proteínas transmembrana con grandes dominios extracelulares que contienen repeticiones similares a factor de crecimiento epidérmico (EGF). El número de parálogos de Notch difiere entre especies. Por ejemplo, hay cuatro receptores Notch en mamíferos (Notch1-Notch4), dos en *Caenorhabditis elegans* (LIN-12 y GLP-1) y uno en *Drosophila melanogaster* (Notch). Los receptores Notch se procesan proteolíticamente durante el transporte a la superficie celular mediante una proteasa similar a furina en un sitio S1 en el lado N-terminal del dominio transmembrana, produciendo una subunidad extracelular de Notch (ECN) y una subunidad transmembrana de Notch (NTM). Estas dos subunidades permanecen asociadas no covalentemente y constituyen el receptor de la superficie celular heterodimérico maduro. Los receptores Notch y la ruta de señalización de Notch se revisan, por ejemplo, en Aster et al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:587-613, 2008, y Bolos et al., Endocrine Reviews 28:339-363, 2007.

25

Las subunidades de ECN de Notch2 contienen 36 repeticiones similares a EGF N-terminales seguidas de tres módulos repetidos en tándem de repeticiones de Lin 12/Notch (LNR) que preceden al sitio S1. Cada módulo LNR contiene tres enlaces disulfuro y un grupo conservado de restos ácidos y polares que se predice que coordinan a un ión de calcio. Dentro de la región de repetición de EGF se encuentran sitios de unión para los ligandos activadores.

30

El NTM de Notch2 comprende una región extracelular (que porta el sitio de escisión de S2), un segmento transmembrana (que porta el sitio de escisión de S3), y una gran porción intracelular que incluye un dominio de RAM23, seis repeticiones de anquirina, un dominio de transactivación y una secuencia de PEST carboxilo termina. La asociación estable de las subunidades ECN y NTM depende de un dominio de heterodimerización (HD) que comprende el extremo carboxilo terminal del ECN (denominado HD-N) y el extremo extracelular amino terminal de NTM (denominado HD-C). Antes de la activación inducida por ligando, Notch se mantiene en una conformación de reposo mediante una región reguladora negativa (NRR), que comprende los tres LNR y el dominio HD. La estructura cristalina del NRR de Notch2 se comunica en Gordon et al., (2007) Nature Structural & Molecular Biology 14:295-300, 2007.

40

La unión de un ligando de Notch a la subunidad ECN inicia dos escisiones proteolíticas sucesivas que suceden mediante proteólisis intramembrana regulada. La primera escisión mediante una metaloproteasa (ADAM17) en el sitio S2 hace que la subunidad transmembrana de Notch sea susceptible a una segunda escisión en el sitio S3 próximo a la cara interna de la membrana plasmática. La escisión en el sitio S3, que está catalizada por un complejo multiproteína que contiene presenilina y nicastrina y que promueve la actividad de  $\gamma$ -secretasa, libera la porción intracelular de la subunidad transmembrana de Notch, permitiendo que se trasloque al núcleo y activando la transcripción de genes diana. (Para una revisión de la escisión proteolítica de Notch, véase, por ejemplo, Sisodia et al., Nat. Rev. Neurosci. 3:281-290, 2002).

45

Se han identificado cinco ligandos de Notch de las clases Jagged y similar a Delta en seres humanos (Jagged1 (también denominado Serrate1), Jagged2 (también denominado Serrate2), similar a Delta 1 (también denominado DLL1), similar a Delta 3 (también denominado DLL3), y similar a Delta 4 (también denominado DLL4)). Cada uno de los ligandos es una proteína transmembrana de un solo pase con un motivo N-terminal conservado Delta, Serrate, LAG-2 (DSL) esencial para la unión a Notch. Una serie de módulos similares a EGF C-terminal respecto del motivo DSL preceden al segmento transmembrana. A diferencia de los receptores Notch, los ligandos tienen colas citoplasmáticas cortas de 70-215 aminoácidos en el extremo C-terminal. Además, se han comunicado otros tipos de ligandos (por ejemplo, DNER, NB3, y F3/Contactina). (Para una revisión de ligandos de Notch y de la activación de Notch mediada por ligandos, véase, por ejemplo, D'Souza et al., Oncogene 27:5148-5167, 2008).

55

La ruta de Notch funciona durante diversos procesos del desarrollo y fisiológicos incluyendo aquellos que afectan a la neurogénesis en moscas y vertebrados. En general, la señalización de Notch está implicada en la inhibición lateral, las decisiones de linaje, y del establecimiento de límites entre grupos de células (véase, por ejemplo, Bray, Molecular Cell Biology 7:678-679,2006). Una diversidad de enfermedades humanas, incluyendo cánceres y trastornos neurodegenerativos, han demostrado ser el resultado de mutaciones en genes que codifican a receptores Notch o sus ligandos (véase, por ejemplo, Nam et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 6:501-509, 2002). La conexión entre la señalización de Notch no restringida y neoplasias se reconoció por primera vez cuando una traslocación cromosómica recurrente

65

t(7:9)(q34:q34.3) que crea una variante truncada constitutivamente activa de Notch1 humana se identificó en un subconjunto de leucemias linfoblásticas agudas humanas (T-ALL) (véase, por ejemplo, Aster et al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:587-613, 2008). En modelos de ratón, se ha demostrado que la señalización de Notch1 es esencial para el desarrollo celular y que las señales mediadas por Notch1 promueven el desarrollo de células T en perjuicio del desarrollo de células B (véase, por ejemplo, Wilson et al., J. Exp. Med. 194:1003-1012, 2001).

Notch2 también está implicada en determinados cánceres. En particular, Notch2 se sobreexpresa en leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), que a su vez da lugar a la sobreexpresión de CD23, un marcador distintivo de las células de B-CLL. (Véase Hubmann et al., Blood 99:3742-3747, 2002). Tanto Notch1 como Notch2 están expresadas de manera elevada en células de mieloma múltiple (células B de plasma cancerosas), y la estimulación con ligando aumenta fuertemente el crecimiento de células tumorales. (Véase Jundt et al., Blood 103:3511-3515, 2004). Notch2 y efectores aguas abajo se sobreexpresan en el melanoma (véase Hoek et al., Cancer Res. 64:5270-5282, 2004; Seykora et al., Am J Dermatopathol 25:6-11, 2003), y el locus de Notch2 se amplifica recurrentemente en líneas celulares de melanoma (Jonsson et al., Oncogene, 26:4738-4748, 2007). Además, numerosos estudios han relacionado la señalización aberrante de Notch2 con el cáncer de mama y otros tumores sólidos (revisado por Leong y Karsay, Blood 107:2223-2233, 2006). Notch2 también es necesario para el desarrollo de células B de zonas marginales. (Véase Pillai et al., Annu. Rev. Immunol. 23:161-196, 2005).

Dada la implicación de la señalización de Notch en una gran variedad de enfermedades humanas, está claro que sigue habiendo necesidad de agentes que regulen la señalización de Notch y que tengan atributos clínicos que sean favorables para su desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

#### SUMARIO

La invención proporciona anticuerpos anti-Notch y métodos para usar los mismos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a NRR de Notch2. En una realización, el anticuerpo inhibe la actividad de Notch2. En otra realización, el anticuerpo no se une significativamente a un miembro de la familia Notch distinto de Notch2. En otra realización, el anticuerpo se une a NRR de Notch2 de ratón y a NRR de Notch2 de ser humano. En otra realización, el anticuerpo se une a un NRR de Notch2 con una Kd de < 10 nM.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 3;
- (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5;
- (d) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 10;
- (e) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 14; y
- (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 19.

En una de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 1-2; una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 6-9; una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 11-13; y una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 15-18. En una de dichas realizaciones, la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15. En otra de dichas realizaciones, la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16. En otra de dichas realizaciones, la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. En otra de dichas realizaciones, la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende además al menos una región marco conservada seleccionada de una región marco conservada de aceptor 2 de VH humano y una región marco conservada consenso de subgrupo 1 de VL kappa humana.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 20-21 y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 22-25. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20 y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22. En una de dichas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22. En otra realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2,1 y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 23-25. En una de dichas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21, y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 23-25.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, o Anticuerpo D-3. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une al dominio LNR-A y al dominio HD-C de Notch2.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>. En otro aspecto, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano.

Cualquiera de las realizaciones anteriores puede estar presente individualmente o en combinación.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la actividad de Notch2, comprendiendo el método exponer a una célula que expresa Notch2 a un anticuerpo como el de cualquiera de las realizaciones anteriores. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aumentada de Notch2, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo como el de cualquiera de las realizaciones anteriores. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una neoplasia de células B, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo como el de cualquiera de las realizaciones anteriores. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar el melanoma, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo como el de cualquiera de las realizaciones anteriores.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aumentada de Notch1, comprendiendo el método administrar conjuntamente a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NRR de Notch1 y un agente terapéutico seleccionado entre dexametasona y tamoxifeno, en el que el agente terapéutico reduce la diferenciación celular intestinal alterada causada por el anticuerpo. En una de dichas realizaciones, el trastorno es una neoplasia de células T.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las secuencias la región hipervariable (HVR) de cadena pesada H1, H2, y H3 de anticuerpos monoclonales anti-NRR de Notch2 denominados Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3, tal como se describe en el Ejemplo B(1). Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat tal como se describe más adelante.

La Figura 2 muestra las secuencias de HVR de cadena ligera L1, L2 y L3 de anticuerpos monoclonales anti-NRR de Notch2 denominados Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3, tal como se describe en el Ejemplo B(1). Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat tal como se describe más adelante.

La Figura 3 muestra un alineamiento de las secuencias de la región variable de cadena pesada del Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. Las HVR están marcadas con recuadros, tal como se describe en el Ejemplo B(1).

La Figura 4 muestra un alineamiento de las secuencias de la región variable de cadena ligera del Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. Las HVR están marcadas con recuadros.

Las Figuras 5A y 5B muestran secuencias marco conservadas consenso pesadas variables (VH) humanas ejemplares para su uso en la práctica de la presente invención. Los identificadores de secuencia son los siguientes:

- marco conservado humano "A" consenso de subgrupo I de VH humana menos las CDR de Kabat (SEC ID N°: 32, 33, 34, 35).
- marcos conservados "B", "C" y "D" consenso de subgrupo I de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 36, 37, 34, 35; SEC ID N°: 36, 37, 38, 35; y SEC ID N°: 36, 37, 39, 35).
- marco conservado humano "A" consenso de subgrupo II de VH humana menos las CDR de Kabat (SEC ID N°: 40, 41, 42, 35).

- marcos conservados "B", "C" y "D" consenso de subgrupo II de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 43, 44, 42, 35; SEC ID N°: 43, 44, 45, 35; y SEC ID N°: 43, 44, 46, y 35).
- marco conservado humano "A" consenso de subgrupo III de VH humana menos las CDR de Kabat (SEC ID N°: 47, 48, 49, 35).
- marcos conservados "B", "C" y "D" consenso de subgrupo III de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 50, 51,49, 35; SEC ID N°: 50, 51,52, 35; y SEC ID N°: 50, 51,53, 35).
- marco conservado humano "A" aceptor de VH humana menos las CDR de Kabat (SEC ID N°: 54, 48, 55, 35).
- marcos conservados "B" y "C" aceptores de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 50, 51,55, 35; y SEC ID N°: 50, 51,56, 35).
- marco conservado humano "A" aceptor 2 de VH humana menos las CDR de Kabat (SEC ID N°: 54, 48, 57, 35).
- marcos conservados "B", "C" y "D" aceptores 2 de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 50, 51, 57, 35; SEC ID N°: 50, 51, 58, 35; y SEC ID N°: 50, 51, 59, 35).

La Figura 6 muestra secuencias marco conservadas consenso ligeras variables (VL) humanas ejemplares para su uso en la práctica de la presente invención. Los identificadores de secuencia son los siguientes:

- marco conservado consenso de subgrupo I de VL kappa humana (kv1): SEC ID N°: 60, 61,62, 63
- marco conservado consenso de subgrupo II de VL kappa humana (kv2): SEC ID N°: 64, 65, 66, 63
- marco conservado consenso de subgrupo III de VL kappa humana (kv3): SEC ID N°: 67, 68, 69, 63
- marco conservado consenso de subgrupo IV de VL kappa humana (kv4): SEC ID N°: 70, 71,72, 63

La Figura 7 muestra secuencias marco conservadas de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

La Figura 8 muestra secuencias marco conservadas de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8 con las modificaciones indicadas. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

Las Figuras 9A y 9B muestran que los anticuerpos anti-NRR1 y anti-NRR2 se unen específicamente a sus receptores afines, tal como se describe en el Ejemplo B(1). (A) Ensayo ELISA que mide la unión de anti-NRR1 (panel izquierdo) y anti-NRR2 (panel derecho) a fragmentos de proteína NRR purificados a partir de cada uno de los receptores humanos (h) y murinos (m). La unión, ilustrada como A<sub>560</sub> en el eje y se representa frente al título de anti-NRR1 o anti-NRR2. (B) Ensayo FACS que mide la unión de anti-NRR1 (paneles 1-6) o anti-NRR2 (paneles 7-12) a células K1-CHO no transfectadas (paneles 1, 4, 7 y 10), a células K1-CHO transfectadas de manera estable con N-myc-Notch1 (paneles 2, 5, 8 y 11) o a células K1-CHO transfectadas establemente con N-myc-Notch2 (paneles 3, 6, 9 y 12). Los transgenes de N-myc-Notch se expresaron bajo el control del promotor tet inducible, última fila, del control de la expresión en ausencia de inducción con doxiciclina (-Dox); fila superior, de la expresión inducida después de la adición de doxiciclina (+Dox); nótese que la línea K1-CHO expresa de manera endógena Notch2, que se detecta mediante anti-NRR2 en presencia y ausencia de doxiciclina (por ejemplo, compárense los paneles 7 y 10).

Las Figuras 10A-C demuestran que anti-NRR1 y anti-NRR2 inhiben específicamente la señalización a partir de sus receptores diana, incluyendo receptores que portan mutaciones activantes, tal como se describe en los Ejemplos B(2) y B(3). (A) Ensayo de co-cultivo que mide la inhibición de la señalización de Notch1 de anti-NRR1. Se usaron células NIH-3T3 transfectadas establemente con Jag1 para inducir la señalización de Notch en células NIH-3T3 transfectadas establemente con Notch1 (excepto para "-Jag1", que usó células NIH-3T3 no transfectadas en lugar de las células que expresaban Jag1). La señalización de Notch se midió usando un gen indicador de Notch (CLS, promotor dependiente que dirige la expresión de luciferasa de luciérnaga) y se expresa en relación a la expresión del gen de control (promotor constitutivo que dirige la expresión de luciferasa de Renilla) normalizada a las condiciones DAPT (definidas como un valor de 1). +Jag1, ensayo de co-cultivo convencional; DMSO, solo vehículo DAPT; DAPT, 5 mM en DMSO; α-gD, anticuerpo de control de isotipo a 2000 ng/ml; α-NRR1, anticuerpo anti-NRR1 a las concentraciones indicadas; los cuatro últimos ensayos incluyeron 80 ng/ml de α-NRR1 o de α-gD más fragmentos NRR de proteína Notch1 o Notch2 purificados, según se indica (+NRR1 o +NRR2). (B) Ensayo de co-cultivo que mide la inhibición de la señalización de Notch2 de anti-NRR2. Se usaron células NIH-3T3 transfectadas de manera estable con Jag1 para inducir la señalización de Notch en células U87MG, que expresan altos niveles de Notch2. El ensayo se llevó a cabo tal como se describe en (A). (C) Ensayo de co-cultivo que mide la inhibición de la señalización de Notch1 de anti-NRR1 a partir de receptores de Notch1 de tipo silvestre o mutantes. El ensayo se llevó a cabo como en (A) excepto que las células que expresaban el receptor se generaron mediante transfección transitoria de plásmidos que expresaban los receptores de Notch1 indicados. TS, Notch1 de tipo silvestre; ΔPEST, Notch1 que carece del dominio PEST; L1594P, Notch1 que porta la mutación puntual constitutivamente activante indicada; E25, anticuerpo de control de isotipo a 625 ng/ml; α-NRR1, anticuerpo anti-NRR1 a 625 ng/ml; DMSO, solo vehículo GSI; DAPT, 5 mM en DMSO; CmpE, compuesto E 1 mM en DMSO.

Las Figuras 11A-D muestran que anti-NRR1 y anti-NRR2 funcionan como inhibidores específicos de receptor *in vivo*, tal como se describe en el Ejemplo B(4). Se inyectó cuatro veces cada cuatro días a ratones Balb/c con 5 mg/kg de control de isotipo α-gD, α-NRR1 o α-NRR2, y se recogieron las células del timo o del bazo en el día 13, un día después de la cuarta dosis. (A) Medidas del peso del timo. Los pesos del timo (en mg) se expresan en relación al peso corporal total (en g). Los valores representan la media más la desviación estándar para tres ratones por grupo. (B) Recuento celular del timo. (C) FACS de CD4 y CD8 FACS para identificar células T dobles positivas a CD4+/CD8+. Los números representan el porcentaje de células tímicas en las poblaciones dobles negativas,

positivas simples y dobles positivas. En relación al control anti-Gd (77,5 %), anti-NRR1 redujo dramáticamente el porcentaje de células en la población CD4+/CD8+ (5,89 %) mientras que anti-NRR2 (80 %) no tuvo un efecto significativo. (D) FACS de CD21 y CD23 FACS para identificar células B de zona marginal. Los números representan los porcentajes medios  $\pm$  desviación estándar (de tres animales) de células en el portal de MZB, que se encuentra recuadrado; también se indican los valores de p; se representan las gráficas de puntos de uno de los tres animales en cada grupo. En relación al control anti-Gd (6,61 %), anti-NRR2 eliminó prácticamente a las células MZB (0,97 %) mientras que anti-NRR1 (6 %) no tuvo un efecto significativo.

En las Figuras 12A-D, una estructura de 2,2 Å de co-cristal de Fab anti-NRR1/NRR1 indica que anti-NRR1 entra en contacto simultáneamente con los dominios LNR-A, LNR-B y HD-C, tal como se describe en el Ejemplo B(5). (A) Tabla que resume la unión de  $\alpha$ -NRR1 o  $\alpha$ -NRR2 a fragmentos de proteína quimérica de NRR de Notch1 o NRR de Notch2. Los fragmentos de proteína NRR indicados (azul oscuro, secuencias de Notch1; azul claro, secuencias de Notch2) se expresaron como proteínas secretadas fusionadas a fosfatasa alcalina para permitir medidas rápidas de unión de anticuerpos en un ensayo basado en placas. Después de usar la actividad de fosfatasa alcalina para normalizar la expresión y secreción de NRR, se añadió medio de cultivo que contenía las proteínas quiméricas de NRR a una placa de 96 pocillos que se había recubierto con  $\alpha$ -NRR1,  $\alpha$ -NRR2 o un anticuerpo de control de isotipo (usado para evaluar la unión de fondo, no mostrado). La unión de anticuerpo se evaluó midiendo la actividad de fosfatasa alcalina que permaneció unida a la placa. Y, unión fuerte; N, ninguna unión observada; W, unión débil observada. (B) Estructura de NRR1 de Notch humano. NRR1 se muestra como representación de C-alfa. Los tres iones de calcio en los motivos LNR se muestran como esferas. La posición del sitio de escisión S2 se marca con una flecha. (C) Superposición de NRR1 sobre NRR2 (cadena A de pdb code 2004) basada en átomos estructuralmente conservados. NRR1 (sombreada) y NRR2 (blanca) se muestran como trazos C-alfa. (D) Vista de libro abierto de la interfaz entre NRR1 (izquierda) y Fab de  $\alpha$ -NRR1 (derecha, el borde entre las cadenas pesada y ligera mostrado como una línea discontinua negra). Se indica el alcance al que el área superficial accesible a disolvente está enterrada por la formación de complejos. Se marcan los restos que están enterrados en al menos un 50 %, con los restos de NRR idénticos en Notch1 y Notch2 marcados con la fuente en color negro (véase también la Figura 18).

Las Figuras 13A-C muestran que anti-NRR1 causa hiperbrotación de células endoteliales, tal como se describe en el Ejemplo B(6). (A) Ensayo de brotación de células endoteliales *in vitro*. Se recubrieron HUVEC sobre pelotas de Cytodex y se co-cultivaron con fibroblastos de piel. Los cultivos se trataron bien con placebo (control) o se trataron con DBZ 1 mM, 5 mg/ml de  $\alpha$ -NRR1 o 5 mg/ml de a-D114. Barra = 100  $\mu$ m. (B) Medidas de longitud de brotación de los cultivos en (A). (C) Ensayo retinal de ratón neonato para brotación de células endoteliales y angiogénesis. Se inyectó a ratones neonatos en P1 y P3 con los anticuerpos indicados, y se prepararon las retinas en P5 para visualizar la perfusión de isolectina o del marcador Ki67 para proliferación. Paneles I y II, Barra = 1 mm. Los paneles III-VI representan magnificaciones de los paneles I y II, barra = 0,2 mm.

Las Figuras 14A-E muestran que el bloqueo selectivo de la señalización de Notch1 con anticuerpos interrumpe la angiogénesis tumoral e inhibe el crecimiento tumoral, tal como se describe en el Ejemplo B(7). Gráficas para tres modelos de xenoinjerto tumoral que muestran volumen tumoral (media  $\pm$  DTM) frente al tiempo después del tratamiento con los anticuerpos indicados:  $\alpha$ -Ambrosía (control negativo),  $\alpha$ -VEGF o  $\alpha$ -NRR1. Los valores de p se muestran para la comparación de  $\alpha$ -Ambrosía frente a  $\alpha$ -NRR1. (A) Modelo de Calu6. (B) Modelo de HM7. (C) Modelo de HM7 con titulación de la dosis de  $\alpha$ -NRR1. (D) Tinción de células endoteliales en secciones de tumor representativas del modelo Calu6 mostrado en (A). Los anticuerpos usados en el modelo de xenoinjerto se muestran en la parte superior. DAPI y a-CD31 se usaron para teñir ADN y células endoteliales, respectivamente. La fila inferior de paneles muestra la las imágenes fusionadas. Barra = 50  $\mu$ m. (E) Cuantificación de la tinción de CD31 mostrada en (D). Usando ImageJ para cuantificar la tinción de CD31 y DAPI en imágenes similares a las mostradas en (D), se representó la tinción relativa de CD31 (tinción de CD31 normalizada a tinción de DAPI) para cada uno de los tres tratamientos de anticuerpos en relación al control de  $\alpha$ -Ambrosía, que se ajustó a un valor de 1; los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar a lo largo de 8 campos de imagen.

Las Figuras 15A-C muestran que el bloqueo selectivo de Notch1 mediante anticuerpos es suficiente para alterar el destino celular en el intestino delgado, tal como se describe en el Ejemplo B(8). (A) Cambio total en peso corporal (media  $\pm$  desviación estándar) frente al tiempo. Se trató a los ratones tal como se describe en la Figura 11 con control de isotipo anti-gD, LT $\beta$ R-Fc, anti-NRR1 o anti-NRR2. Las flechas marcan los días de dosificación. (B) Análisis inmunohistoquímicos de intestinos delgados. Se trató a los ratones con las concentraciones indicadas de control de isotipo anti-gD, DBZ o anti-NRR1 en los días 0, 2 y 6, y se prepararon los intestinos delgados para los análisis inmunohistoquímicos en el día 7. En cada fila según se indica, la tinción se muestra para hematoxilina y eosina (H y E), Alcian Blue para mucina y para marcar células calciformes secretoras, lisozima para marcar células de Paneth, Ki-67 para proliferación y Hes1 como una diana aguas abajo de Notch. Véanse las Figuras 19 y 20 para análisis del intestino grueso en el día 7 y del intestino delgado en el día 2, respectivamente. Barra = 40 mm. (C) Comparación de la inhibición específica de Notch1 frente a Notch2 en la diferenciación de células del intestino delgado. Los intestinos delgados del estudio descrito en (A) se prepararon para Alcian Blue y Ki-67 un día después de la dosificación final con  $\alpha$ -gD,  $\alpha$ -NRR1 o  $\alpha$ -NRR2, tal como se indica. Barra = 50 mm.

La Figura 16 muestra que anti-NRR1 es un potente inhibidor de la señalización de Notch1 inducida por múltiples ligandos, tal como se describe en el Ejemplo B(2). Se llevaron a cabo ensayos de co-cultivo de señalización de Notch1 tal como se describen en la Figura 10A excepto en que las células que expresaban ligando expresaban Jag1, Jag2 o D111, tal como se indica.

La Figura 17 muestra construcciones de proteína quimérica de baja producción de NRR de Notch1/NRR de Notch2, tal como se describe en el Ejemplo B(5). La tabla complementa a la Figura 12A, listando las proteínas

quiméricas de NRR que produjeron poca o ninguna actividad de fosfatasa alcalina, lo que sugiere que las quimeras se plegaban mal o eran de otro modo inestables. Para aquellos fragmentos que produjeron una actividad débil pero detectable de fosfatasa alcalina, se resume la unión de  $\alpha$ -NRR1 o  $\alpha$ -NRR2. —, sin expresión y unión no ensayable; N, sin expresión o unión; W, expresión o unión débil.

La Figura 18 muestra la conservación de restos de NRR1 puestos en contacto por anti-NRR1, tal como se describe en los Ejemplos B(1) y B(5). Alineamiento de secuencia de aminoácidos del dominio NRR de Notch1 humano (SEC ID N°: 26), dominio NRR de Notch1 de ratón (SEC ID N°: 27), dominio NRR de Notch2 humano (SEC ID N°: 28) y dominio NRR de Notch2 de ratón (SEC ID N°: 29), con los límites del subdominio mostrados a la derecha. Se lista NRR de Notch1 humano como secuencia de referencia, y los restos en las otras secuencias NRR que son idénticos a aquellos en Notch1 humano se muestran en fuente negrita. Los restos que están enterrados en al menos un 25 % en la estructura Fab anti-NRR1/NRR de Notch1 (Figura 12) están destacados con líneas continuas frente a las líneas discontinuas que reflejan un grado mayor de enterramiento de los restos. De los 21 aminoácidos que están enterrados en al menos un 25 % en la secuencia de Notch1 humano, los 21 son idénticos a la secuencia de Notch1 de ratón pero solo seis son idénticos en las secuencias de Notch2 de ser humano y de ratón (más una séptima diferencia conservativa de T en lugar de S en Notch1 S1712 humano); de estos restos idénticos y "enterrados" en las secuencias de Notch2, ninguno se encuentra en la clase de > 75 % enterrado. Esta comparación de secuencias es coherente con (a) fuerte unión de anti-NRR1 (afinidades aproximadamente iguales) a Notch1 tanto humano como de ratón y (b) una ausencia de unión de anti-NRR1 a Notch2 de ser humano y de ratón. Además, todos los restos enterrados se encuentran dentro de los LNR-A, LNR-B y HD-C, lo que es coherente con el experimento de intercambio de dominio mostrado en las Figuras 11A y 17.

La Figura 19 muestra que el bloqueo selectivo de Notch1 mediante anticuerpos es suficiente para alterar el destino celular en el intestino delgado, tal como se describe en el Ejemplo B(8). Análisis histopatológicos de muestras de intestino grueso tomadas en el día 7 del experimento descrito en la Figura 15B.

La Figura 20 muestra que los cambios en el destino celular intestinal se desarrollan 2 días después de bloquear Notch1, tal como se describe en el Ejemplo B(8). Análisis histopatológicos de muestras de intestino delgado tomadas en el día 2 del experimento descrito en la Figura 15B, que muestra muestras tomadas en el día 7.

La Figura 21 muestra que anti-NRR1 no bloquea la señalización inducida por Notch2 *in vitro*, tal como se describe en el Ejemplo B(2). Ensayo de co-cultivo en células U87MG, tal como se describe en la Figura 10B. Aunque anti-NRR1 inhibe potentemente la señalización de Notch1 *in vitro* (Figura 10A) e *in vivo* (Figuras 11A-C), no afecta a la señalización de Notch2, incluso cuando se usa a una concentración (1000 ng/ml) que es más de 100 veces mayor que la  $CI_{50}$ . Este resultado es coherente con la unión específica de anti-NRR1 a Notch1 (Figuras 9 y 12) así como con la ausencia de inhibición de Notch2 por anti-NRR1 *in vivo* (Figura 11D).

La Figura 22 muestra posibles efectos sinérgicos de anti-NRR1 y anti-NRR2 en la diferenciación de células intestinales, tal como se describe en el Ejemplo B(8).

La Figura 23 muestra que la dexametasona rescata al menos parcialmente el fenotipo intestinal causado por anti-NRR1, tal como se describe en el Ejemplo B(9).

Las Figuras 24A y B muestran que el bloqueo selectivo de Notch1 o Notch2 minimiza o evita la metaplasia de células calciformes asociada con la inhibición pan-Notch, mientras que el bloqueo de ambos Notch1 y Notch2 causa una metaplasia severa de células calciformes. (A) Tal como se describe en el ejemplo B(8), se dosificó a los ratones con 5 mg/kg de anti-NRR1, anti-NRR2, o ambos, o con un anticuerpo anti-gD de control negativo en los días marcados con flechas; se muestra el cambio total de peso corporal (media  $\pm$  desviación estándar) frente al tiempo. (B) Análisis inmunohistoquímicos de intestinos delgados de ratones tratados como en (A), usando Alcian Blue para mucina para marcar células calciformes secretoras.

Las Figuras 25A y 25B muestran que anti-NRR2 (citado como "anti-N2") inhibe el crecimiento de las líneas celulares de melanoma humano SK23 y LOX-IMVI *in vitro*, tal como se describe en el Ejemplo B(10).

La Figura 26 muestra el efecto de anti-NRR2 (citado como "anti-Notch2") en cinco líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (listadas a la derecha). Tal como se describe en el Ejemplo B(11), el crecimiento de una de las líneas celulares, "DB" se inhibió fuertemente mediante tratamiento con anti-NRR2.

La Figura 27 muestra el efecto de anti-NRR2 (citado como "anti-Notch2") en el crecimiento de la línea celular DB de DLBCL a lo largo del tiempo, tal como se describe en el Ejemplo B(11).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

La invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a Notch y a métodos para usar los mismos, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión o actividad de Notch.

### I. TÉCNICAS GENERALES

Las técnicas y procedimientos descritos o citados en el presente documento se entienden bien generalmente y se emplean de manera común usando metodologías convencionales por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: *A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, y *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed.,

1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

## II. DEFINICIONES

15 Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea adecuado, los términos usados en singular también incluirán el plural y *vice versa*. En caso de que cualquier definición expuesta a continuación entre en conflicto con cualquier documento citado en el presente documento, regirá la definición expuesta a continuación.

20 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada.

25 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, se purifica un anticuerpo (1) a más de un 95 % en peso de anticuerpo determinado mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, a más del 99 % en peso; (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácido N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, porque al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_h$ ) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable ( $V_l$ ) en un extremo y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos concretos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

La expresión "anticuerpo anti-NRR de Notch1" o "un anticuerpo que se une a NRR de Notch1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NRR de Notch1 con suficiente afinidad de tal modo que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a Notch1. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-NRR de Notch1 a una proteína no relacionada, no de Notch es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a NRR de Notch1 según se mide, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a NRR de Notch1 tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $< 1 \mu\text{M}$ ,  $< 100 \text{nM}$ ,  $< 10 \text{nM}$ ,  $< 1 \text{nM}$ , o  $< 0,1 \text{nM}$ . En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch1 se une a un epítipo de Notch que está conservado entre Notch de diferentes especies, por ejemplo, roedores (ratones, ratas) y primates.

La expresión "anticuerpo anti-NRR de Notch2" o "un anticuerpo que se une a NRR de Notch2" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NRR de Notch2 con suficiente afinidad de tal modo que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a Notch2. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-NRR de Notch2 a una proteína no relacionada, no de Notch es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a NRR de Notch2 según se mide, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a NRR de Notch2 tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $< 1 \mu\text{M}$ ,  $< 100 \text{nM}$ ,  $< 10 \text{nM}$ ,  $< 1 \text{nM}$ , o  $< 0,1 \text{nM}$ . En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 se une a un epítipo de Notch que está conservado entre Notch de diferentes especies, por ejemplo, roedores (ratones, ratas) y primates.



La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede citarse como "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede citarse como "VL". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

5 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones del dominio variable difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más elevadamente conservadas de dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de beta-lámina, conectada mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de beta-lámina. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestra varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

20 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

25 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen de manera general en, por ejemplo, Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo con otras una o más proteínas o péptidos.

35 Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no como fragmentos de anticuerpo tal como se definen más adelante. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

40 Un "anticuerpo desnudo" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o a un radiomarcador.

45 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, comprendiendo preferentemente la región de unión a antígeno de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

50 La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno y es todavía capaz de reticular antígeno.

55 "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie de dos cadenas Fv consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente mediante un enlazante peptídico flexible de tal modo que las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De manera colectiva, las seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

65 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente

documento para Fab' en el que el resto (o los restos de cisteína) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

5 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de scFv comprende además un enlazante polipeptídico entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

10 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser divalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetraacuerpos también se describen en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

20 La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto en posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica la característica de que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a antígeno se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión a diana de una diversidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una diversidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en tanto que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

40 El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975). Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen la totalidad o partes de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes de los Estados Unidos con números 5.545.807, 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

60 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos

PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante, por ejemplo, inmunización de macacos con el antígeno de interés.

5 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los restos de una HVR del receptor se sustituyen por restos de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, ratas, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden efectuarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998). Harris, *Biochem. Soc. Transaction* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) y las Patentes de los Estados Unidos Nos 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con aquella de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se divulgan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar usando varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han deshabilitado, por ejemplo, "xenoratoses" inmunizados (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 6.075.181 y 6.150.584 referentes a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) referente a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de células B.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR, tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular juega un papel único, confiriendo una especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido de origen natural que consisten solo en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Se usan y están abarcadas en el presente documento una serie de delineaciones de HVR. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las que se usan más comúnmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, por su parte, se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35

## ES 2 541 726 T3

(Numeración de Chothia)

H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58  
H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" del modo siguiente: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et al., anteriormente citado, para cada una de estas definiciones.

5 Los restos "marco conservados" o "FR" son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la HVR, tal como se definen en el presente documento.

10 Las expresiones "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat" y variantes de las mismas se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la complicación de anticuerpos en Kabat et al., anteriormente citado. Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o a una inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

20 El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU comunicado en Kabat et al., anteriormente citado). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de IgG1. A menos que se afirme lo contrario en el presente documento, las referencias a los números de resto en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración de restos mediante el sistema de numeración de Kabat. A menos que se afirme lo contrario en el presente documento, las referencias a los números de resto en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración de restos mediante el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2008/0181888 A1, Figures for EU numbering).

35 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse usando determinados procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante reordenamiento de los dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de restos de HVR y/o marco conservados se describe por, por ejemplo, Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995). Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

45 Un anticuerpo "bloqueante" o "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Algunos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben de forma sustancial o completa la actividad del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita parcial o totalmente al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

50 Los anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son aquellos que evitan o reducen la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede prevenir o reducir la proliferación de células cancerosas *in vitro* y/o *in vivo*.

55 Los anticuerpos que "inducen la apoptosis" son aquellos que inducen la muerte celular programada según se determina mediante ensayos de apoptosis convencionales, tales como unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

60 Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de

anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, se ha definido que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo terminal de la misma. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o diseñando por ingeniería genética el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; CDC; unión a receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras necesitan generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo., un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos tal como se divulgan, por ejemplo, en las definiciones del presente documento.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no-A y A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como variantes de origen natural de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa a causa de la modificación de al menos un aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante del presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente un 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de homología con esta, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % con esta.

Un "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRN, y FcγRIN, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de aquellos receptores. Los receptores FcγRN incluyen FcγRNA (un "receptor activante") y FcγRNB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activante FcγRNA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRNB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase, por ejemplo, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" del presente documento.

La expresión "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton et al.).

Pueden ensayarse la unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. En determinadas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC),

linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos, y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

"La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que una Ig unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos, y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que porta un antígeno y posteriormente eliminar a la célula diana con citotoxinas. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan FcγRI, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede efectuarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337 o en la Patente de Estados Unidos N° 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen PBMC y células NK. Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica de complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase adecuada), que están unidos a su antígeno afín. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.551 y en el documento WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

La expresión "anticuerpo que comprende región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería genética recombinante del ácido nucleico que codifica al anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

La "afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por su constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen lentamente al antígeno y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. Las realizaciones específicas ilustrativas y ejemplares para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

En una realización, la "Kd" o el "valor de Kd" se mide mediante un ensayo de unión con antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por su antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con <sup>125</sup>I en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, y a continuación capturar el antígeno unido con una placa revestida de anticuerpo contra Fab (véase, por ejemplo, Chen, et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren durante toda una noche placas multipocillo MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 mg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente se bloqueó con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc N° 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de [<sup>125</sup>I]-antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incubaba entonces durante toda una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con TWEEN-20™ al 0,1 % en PBS. Cuando se secan las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan una unión menor o igual al 20 % de la máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, se mide la Kd o el valor de Kd usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con antígeno inmovilizado en microplacas CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan microplacas de

biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~ 0.2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las medidas cinéticas se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ . Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación sobrepasa los  $10^6 M^{-1} s^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, puede determinarse la velocidad de asociación usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ 8000-series (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " $k_{on}$ " de acuerdo con la presente invención también puede determinarse tal como se describe anteriormente usando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", tal como se usa en el presente documento, indica un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de tal manera que un experto en la materia podría considerar que la diferencia entre los dos valores es de poca significancia biológica y/o estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de  $K_d$ ). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente un 50 %, menor de aproximadamente un 40 %, menor de aproximadamente un 30 %, menor de aproximadamente un 20 %, y/o menor de aproximadamente un 10 % en función del valor de referencia/comparación.

La expresión "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", tal como se usa en el presente documento, indica un grado de diferencia suficientemente alto entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparación) de tal manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es estadísticamente significativa en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de  $K_d$ ). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente un 10 %, mayor de aproximadamente un 20 %, mayor de aproximadamente un 30 %, mayor de aproximadamente un 40 %, y/o mayor de aproximadamente un 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparación.

Una "región marco conservada humana aceptora" o una "región marco conservada aceptora humana" para los fines del presente documento es una región marco conservada que comprende la secuencia de aminoácidos de una región marco conservada de VL o VH derivada de una región marco conservada de inmunoglobulina humana o de una región marco conservada consenso humana. Una región marco conservada humana aceptora "derivada de" una región marco conservada de inmunoglobulina humana o una región marco conservada consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En los casos donde estén presentes cambios de aminoácidos preexistentes en una VH, estos cambios aparecen preferentemente en solo tres, dos, o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, la región marco conservada humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia marco conservada de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia marco conservada consenso humana.

Una "región marco conservada consenso humana" es una región marco conservada que representa los restos de aminoácidos de aparición más común en una selección de secuencias marco conservadas de VL o VH de inmunoglobulina humanas. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humanas es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., anteriormente citado. En una realización, para la VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat et al., anteriormente citado. En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al., anteriormente citado.

Una "región marco conservada consenso de subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat et al., anteriormente citado. En una realización, una región marco conservada aceptora humana se deriva de la región marco conservada consenso de subgrupo III de VH que comprende al menos una parte o todas las secuencias siguientes: (SEC ID N°: 50)-H1-(SEC ID

Nº: 51)-H2-(SEC ID Nº: 57 o 59)-H3-(SEC ID Nº: 35). En algunas realizaciones, el último resto (S11) de la SEC ID Nº: 35 está sustituido por una alanina.

5 Una "región marco conservada consenso de subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat et al., anteriormente citado. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región marco conservada consenso de subgrupo I de VH comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias: (SEC ID Nº: 60)-L1-(SEC ID Nº: 61)-L2-(SEC ID Nº: 62)-L3-(SEC ID Nº: 63).

10 "Purificada" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos el 95 % en peso, o al menos un 98 % en peso de la muestra en la que está contenida.

15 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que está separada de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que se asocia normalmente, por ejemplo, en su ambiente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosomalmente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

20 El término "vector", tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN bicatenario circular al que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse autónomamente en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos).  
25 Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinante" o simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente.

35 Un "polinucleótido" o "ácido nucleico" tal como se usa de manera indistinta en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, puede conferirse la modificación a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender modificaciones efectuadas después de la síntesis, tales como conjugación a un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapones", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse mediante grupos protectores convencionales, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse a soportes sólidos o semi-sólidos. Los OH en los 5' y 3' terminales pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de tapado orgánicos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. También pueden derivatizarse otros hidroxilos a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluor- o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcares, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos, y análogos de nucleósido básicos, tales como metil ribósido. Pueden reemplazarse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO, o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en los que cada uno de R o R' es independientemente H o alquilo (C 1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos citados en el presente documento, incluyendo ADN y ARN.

65



Un "oligonucleótido", tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que, generalmente, pero no necesariamente, tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos puede aplicarse igual y por completo a los oligonucleótidos.

El término "Notch", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier Notch nativo (Notch1-4) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca Notch sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de Notch que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de Notch de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas.

El término "Notch1", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier Notch1 nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca Notch1 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de Notch1 que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de Notch1 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas.

El término "Notch2", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier Notch2 nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca Notch2 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de Notch2 que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de Notch2 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas.

La expresión "actividad de Notch2" se refiere a la señalización de Notch2. Un agente (por ejemplo, un anticuerpo) que "inhibe la actividad de Notch2" disminuye significativamente la señalización de Notch2 en relación al nivel de señalización de Notch2 observado en un control adecuado en condiciones sustancialmente idénticas. En determinadas realizaciones, la actividad de Notch2 puede evaluarse mediante un ensayo de indicador adecuado, tal como se describe en el presente documento en el Ejemplo B(2). En determinadas realizaciones, la actividad de Notch2 puede evaluarse midiendo la generación de células B de zona marginal, tal como se describe en el presente documento en el Ejemplo B(4). En determinadas realizaciones, la disminución en la señalización de Notch2 es al menos 2, 3, 4, 5, o 10 veces menor al nivel observado en el control.

La expresión "NRR de Notch2" se refiere a una región de Notch2 que consiste en los tres módulos LNR (LNR-A, LNR-B, y LNR-C) y el dominio HD (HD-N y HD-C). Las secuencias de NRR de Notch2 de ser humano y ratón ejemplares se muestran en la Figura 18 (SEC ID N°: 28 y 29, respectivamente). El NRR de Notch2 puede consistir en fragmentos unidos no covalentemente, por ejemplo, que sean el resultado del procesamiento de Notch2 en S1, así como una sola secuencia polipeptídica contigua. A modo de ejemplo y en referencia a la Figura 18, el NRR de Notch2 de ser humano puede consistir en los aminoácidos 1422-1677 de Notch2 humano (SEC ID N°: 75), o como alternativa, los aminoácidos 1422-1608 de la SEC ID N°: 75 unidos no covalentemente a los aminoácidos 1609-1677 de la SEC ID N°: 75.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" respecto de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir los espacios en blanco, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc., y el código fuente, junto con las instrucciones para su uso, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office) Washington D.C., 20559, donde está registrada con el N° de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o

comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

$$100 \text{ VECES LA FRACCIÓN } X/Y$$

donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A para B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

Un "trastorno" es cualquier afección o enfermedad que podría beneficiarse del tratamiento con una composición o método de la invención. Esto incluye trastornos crónicos y agudos que incluyen aquellas patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se tratan en el presente documento incluyen afecciones, tales como cáncer.

"Las neoplasias de células B" también denominadas "neoplasmas de células B" incluyen, pero sin limitación enfermedad de Hodgkin (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin predominante de linfocitos (LPHD)); linfoma no-Hodgkin (NHL); linfomas del centro celular folicular (FCC); leucemia linfocítica aguda (ALL, también llamada B-ALL); leucemia linfoblástica de células B precursoras; leucemia linfocítica crónica (CLL, también llamada B-CLL); tricoleucemia; linfomas de células B de zona marginal (incluyendo de tipo nodal, MALT, y esplénico); mieloma múltiple (masmicitoma, mieloma de células plasmáticas); linfoma de células pequeñas no escindidas (por ejemplo, linfoma de Burkitt); linfomas de células grandes (incluyendo difuso de células grandes (células B), difuso de células mixtas, y linfoma inmunoblástico); linfoma de células del manto, linfoma linfocítico de células pequeñas; linfoma asociado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom. El linfoma indolente es una enfermedad de crecimiento lento e incurable en la que el paciente sobrevive de media entre seis y 10 años, tras numerosos periodos de remisión y recaída; los linfomas agresivos son formas de crecimiento rápido del linfoma que abarcan NHL de alto grado y algunas categorías de grado intermedio.

El término "melanoma" se refiere a un tumor maligno de los melanocitos, que se encuentran principalmente en la piel, pero que también se encuentran en el ojo (melanoma uveal) o en los intestinos.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar" o "para tratar") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula que se esté tratando, y se puede realizar tanto como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen evitar la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, la mejora o alivio de la patología, y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para frenar la progresión de una enfermedad o trastorno.

Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En determinadas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales de deporte, mascotas (tales como gatos, perros, y caballos), primates, ratones y ratas. En determinadas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma que permite la actividad biológica del principio activo para que sea efectivo, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de cualquier microorganismo viviente y sus esporas.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores, tales como la patología, la edad, sexo, y peso del individuo, y de la capacidad de la sustancia/molécula para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula se ve sobrepasado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>212</sup>Pb e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diferentes agentes antineoplásicos y anticancerosos descritos a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilaminas incluyendo altretamina, trietilenamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas, ácido betulínico; una camptotequina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCANTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozolesina, carzelesina y bizelesina); podofiloxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sacrodictina; espongiostatina, mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliceamicina, especialmente caliceamicina gamma 1I y caliceamicina omega 1I (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de integrina alfa-4 oral; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína de enediína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolo-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®), y desoxodoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, porfirubicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de 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, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, flouxuridina, andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona, antiadrenales como aminoglutimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico, tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazacouona, elfornitina; acetato de eliptinio, una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio, hidroxurea, lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona, 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicouona; 2,2',2'-tricloroetilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de paclitaxel en nanopartículas diseñada en albúmina (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de la tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina, ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS2000; difluorometilomitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN®, y la vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®,

Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteasoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sodio (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición más adelante); inhibidores de tiroxina cinasa (véase la definición más adelante); inhibidores de serina-treonina cinasa, tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura de una pauta terapéutica con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterapéuticos definidos en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de las hormonas que estimulan el crecimiento del cáncer. Puede tratarse de las propias hormonas, incluyendo, pero sin limitación: antiestrógenos con perfil agonista/antagonista mixto, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, queoxifeno, y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar la renovación de ER, y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores esteroideos de aromatasa, tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroideos, tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, y 4(5)-imidazoles; agonistas de hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y tripterelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas, tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos, tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides, tales como fluoximesterona, ácido todo transretinoico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa Notch) bien *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tales como una célula que expresa Notch) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un sitio distinto de fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también se extienden a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer, ambos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando su despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

### III. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

La invención se basa, en parte, en la identificación de agentes de unión a Notch, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de los mismos. En realizaciones específicas, la invención se refiere a agentes de unión a la región reguladora negativa (NRR) de Notch2, tales como anticuerpos aislados que se unen a NRR de Notch2 y a fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con la expresión y/o actividad de Notch2 (por ejemplo, expresión o actividad aumentadas). En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-NRR de Notch2 son útiles para el diagnóstico o tratamiento del cáncer, por ejemplo, neoplasias de células B y melanoma. Por consiguiente, la invención proporciona métodos, composiciones, kits, y artículos de fabricación relacionados con la unión a NRR de Notch2.

#### A. Anticuerpos anti-NRR de Notch2

##### 1. *Anticuerpos derivados de fagoteca ejemplares*

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales ejemplares derivados de una fagoteca, tal como se describe en el Ejemplo B. Se aisló un anticuerpo denominado "Anticuerpo D" que se une a NRR de Notch2. Ese anticuerpo se maduró por afinidad para generar los anticuerpos denominados Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. Las secuencias de las regiones hipervariables (HVR) de la cadena pesada y de la cadena ligera de Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y Anticuerpo D-3 se muestran en las Figuras 1 y 2. Las secuencias de

los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y Anticuerpo D-3 se muestran en las Figuras 3 y 4. También se proporcionan realizaciones adicionales de anticuerpos anti-NRR de Notch2 a continuación.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVR seleccionadas entre:

- (a) una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 3;
- (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5;
- (d) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 10;
- (e) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 14; y
- (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 19.

En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 y al menos una, dos, tres, cuatro, o cinco HVR seleccionadas entre (a), (b), (d), (e), y (f) anteriores. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende (a), (b), (c), (d), (e), y (f) anteriores. Con respecto a (a), (d), (e), y (f), se contemplan una cualquiera o más de las siguientes realizaciones: HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 1-2; HVR-L1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 6-9; HVR-L2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 11-13; y HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 15-18.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 3, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5. En una realización, HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 1-2.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 10, una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 14, y una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 19. Las siguientes realizaciones se contemplan en cualquier realización: HVR-L1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 6-9; HVR-L2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 11-13; y HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 15-18. En una realización, un anticuerpo que se une a NRR de Notch2 comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15. En otra realización, un anticuerpo que se une a NRR de Notch2 comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16. En otra realización, un anticuerpo que se une a NRR de Notch2 comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. En otra realización, un anticuerpo que se une a NRR de Notch2 comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18.

En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
- (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5;
- (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6;
- (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y
- (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
- (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5;

- (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7;
- (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y
- (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
- (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5;
- (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8;
- (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; y
- (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
- (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5;
- (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9;
- (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13; y
- (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18.

En determinadas realizaciones, cualquiera de las realizaciones anteriores comprende además al menos una región marco conservada seleccionada de una región marco conservada consenso de subgrupo III de VH y una región marco conservada consenso de subgrupo I de VL.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 se madura por afinidad. Por ejemplo, pueden efectuarse una cualquiera o más de las siguientes sustituciones en las posiciones indicadas de HVR (numeración de Kabat) en cualquier combinación:

- en HVR-H1 (SEC ID N°: 1): S28T; T30S;
- en HVR-L1 (SEC ID N°: 6): S28N; I29N o V; S30R o K; S31R; Y32F
- en HVR-L2 (SEC ID N°: 11): G50R; S53I o T; A55E
- en HVR-L3 (SEC ID N°: 15): S93I o R; L96W o H

Los anticuerpos específicos divulgados en el presente documento, es decir, el Anticuerpo D así como las formas maduras por afinidad del Anticuerpo D (D-1, D-2, y D-3), pueden someterse a maduración por afinidad posterior. Por consiguiente, se proporcionan formas maduras por afinidad de los anticuerpos descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que tiene cualquiera de las secuencias de HVR anteriores puede comprender además cualquier secuencia de dominio variable marco conservado adecuado, siempre que se mantenga sustancialmente la actividad de unión a NRR de Notch2. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 comprende una secuencia marco conservada consenso pesada variable (VH) humana, como en cualquiera de las secuencias marco conservadas consenso de VH mostradas en las Figuras 5A y 5B. En una realización, la secuencia marco conservada consenso de VH comprende una secuencia consenso marco conservada de cadena pesada de subgrupo III humana, por ejemplo, tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B. En otra realización, la secuencia marco conservada consenso de VH comprende una secuencia marco conservada de "Aceptor 2", por ejemplo, tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B. En una realización particular, la secuencia consenso marco conservada de VH comprende FR1-FR4 de Aceptor 2B o Aceptor 2D, en el que FR4 comprende la SEC ID N°: 35 (Figuras 5A y 5B), sustituyéndose opcionalmente el último resto de la SEC ID N°: 35 (S11) por alanina. En una realización particular adicional, la secuencia consenso marco conservada de VH comprende las secuencias de las SEC ID N: 50; 51; 57 o 59; y 35, en las que S11 de la SEC ID N°: 35 está opcionalmente sustituido por alanina.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que tiene cualquiera de las secuencias de HVR anteriores puede comprender además una secuencia consenso marco conservada ligera variable (VL) humana tal como se muestra en las Figuras 6A y 6B. En una realización, la secuencia consenso marco conservada de VL comprende una secuencia consenso marco conservada de subgrupo I de VL kappa (kv1) humana, por ejemplo, tal como se muestra en las Figuras 6A y 6B. En otra realización, la secuencia consenso marco conservada de VL comprende FR1-FR4 de huMAb4D5-8, tal como se muestra en las Figuras 7 u 8. En una realización particular, la secuencia consenso marco conservada de VL comprende las secuencias de las SEC ID N: 60, 61, 62, y 63.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 20-21. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o

99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones, o eliminaciones en relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que comprende esa secuencia mantiene la capacidad de unirse a NRR de Notch2. En determinadas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 20-21. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En una realización particular, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre: (a) una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 3, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5. En una de dichas realizaciones, HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 1-2.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 22-25. En determinadas realizaciones, una secuencia VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones, o eliminaciones en relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que comprende esa secuencia mantiene la capacidad de unirse a NRR de Notch2. En determinadas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 22-25. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones ocurren en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En una realización particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de SEC ID N°: 10; (b) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 14; y (c) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se ajusta a la secuencia consenso de la SEC ID N°: 19. En una de dichas realizaciones, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 6-9; (b) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 11-13; y (c) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 15-18. En una de dichas realizaciones, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15. En otra de dichas realizaciones, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16. En otra de dichas realizaciones, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. En otra de dichas realizaciones, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18.

En determinadas realizaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones pueden suceder en las HVR. En dichas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones pueden suceder dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse alteraciones conservativas que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. En determinados casos, las alteraciones en las HVR pueden aumentar de hecho la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en los "puntos calientes" de la HVR (es decir, restos codificados por codones que sufren mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática) para aumentar la afinidad del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008). En determinadas realizaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está bien conservada (sin alterar), o contiene no más de una sola sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende una VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20, y una VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22. En una de dichas realizaciones, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5, y la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15. En una realización

particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22.

5 En otra realización, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que se une específicamente a NRR de Notch2 comprende una VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, y una VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 23-25. En una de dichas realizaciones, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, (b) una  
10 HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 5, y la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas entre (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 7-9; (b) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 11-13; y (c) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 16-18. En realizaciones particulares, el anticuerpo  
15 comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 23-25.

En determinadas realizaciones, se proporciona una forma madurada por afinidad de cualquiera de los anticuerpos anteriores. En realizaciones adicionales, se proporciona una proteína recombinante que se une específicamente a NRR de Notch2, en la que la proteína recombinante comprende sitios de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una de dichas realizaciones, una proteína recombinante comprende una cualquiera o más de las HVR proporcionadas anteriormente.

En determinadas realizaciones, se proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una realización, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En una realización, se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector. En una realización, la célula hospedadora es eucariota. En una realización, la célula hospedadora es una célula CHO. En una realización, se proporciona un método para producir un anticuerpo anti-NRR de Notch2, en el que el método comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica al anticuerpo, y aislar el anticuerpo.

## 30 2. Anticuerpos ejemplares adicionales

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que inhibe la actividad de Notch2. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden modular uno o más aspectos de la señalización de Notch2, incluyendo la interrupción de cualquier ruta de señalización de Notch2 biológicamente relevante.

En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que se une a NRR de Notch2 con una Kd de < 100 nM. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-NRR de Notch2 se une al NRR de Notch2 con una Kd de < 10 nM, < 1 nM, o < 0,1 nM. Tal como se describe en los Ejemplos en el presente documento, el Anticuerpo D-3 de fago ejemplar se une con una Kd de 5 nM. Tal como está bien establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando por su receptor puede determinarse usando cualquiera de una diversidad de ensayos, y se expresa en términos de una diversidad de valores cuantitativos. Por consiguiente, en una realización, la afinidad de unión se expresa como valores de Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). De manera general y preferentemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, bien en una configuración sin células o asociada a células. Puede usarse cualquiera de una serie de ensayos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento para obtener medidas de la afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA), y ELISA.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a NRR de Notch2, en el que el anticuerpo no se une significativamente a un miembro de la familia Notch distinto de Notch2 (es decir, Notch1, 3, y 4 en mamíferos). Dicho anticuerpo puede identificarse usando los ensayos proporcionados en el Ejemplo B(1). En una realización, el anticuerpo se une a NRR de Notch2 humano y a un NRR de Notch2 de al menos una especie no humana distinta, por ejemplo, ratón.

55 En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo proporcionado en el presente documento. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado anti-NRR de Notch2 que se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-NRR de Notch2 que compite con un anticuerpo seleccionado entre Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a al menos un dominio seleccionado entre el dominio LNR-A y el dominio HD-C de Notch2. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo se une tanto al dominio LNR-A como al dominio HD-C. En otra de dichas realizaciones, el anticuerpo se une además a los dominios LNR-B y/o HD-N. Estos dominios se delinean en la Figura 18.

65 Las realizaciones anteriores de anticuerpos anti-NRR de Notch2 pueden estar presentes individualmente o en cualquier combinación. Además, cualquier anticuerpo anti-NRR de Notch2 descrito en el presente documento puede



poseer una o más de las características siguientes: En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>. En otra realización, un anticuerpo anti-NRR de Notch2 es un anticuerpo humanizado, humano o quimérico.

### 3. Fragmentos de anticuerpo

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse mediante medios convencionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En determinados casos hay ventajas en cuanto al uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al., (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítipo de unión a receptor salvajes se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.046. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para el experto en la materia. En determinadas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos N° 5.571.894; y 5.587.458. Los Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están libres de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuadas para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino terminal o carboxilo terminal de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, anteriormente citado. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

### 4. Anticuerpos humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de anticuerpos humanizados puede ser muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que sea más próxima a la del roedor se acepta como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco conservado para diferentes anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623.

Además es generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales

tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y muy sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

#### 5. *Anticuerpos humanos*

Puede construirse anticuerpos humanos de la invención combinando clones de secuencias de dominio variable de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fago derivadas de ser humano con secuencias de dominio constante conocidas tal como se describe anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la invención mediante el método de hibridoma. Se han descrito las líneas celulares del mieloma humano y del heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse el reordenamiento génico para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo de partida no humano. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", se reemplazan bien la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano mediante técnicas de presentación en fago tal como se describen en el presente documento con un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tal la retirada de la cadena no humana correspondiente en el con de presentación en fago primario, es decir, el epítopo rige (deja su impronta) en la selección del compañero de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la tradicional humanización de anticuerpos no humanos injertando las CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o de CDR de origen no humano.

#### 6. *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para Notch2 y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de Notch2. Los anticuerpos biespecíficos se pueden utilizar también para localizar agentes citotóxicos en células que expresan Notch2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a Notch 2 y un brazo que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o un hapteno de isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')<sub>2</sub>).

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se efectúa normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es laboriosa, y el rendimiento de producto es bajo. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan para secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos

parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. En determinadas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan de manera conjunta en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecifico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecifica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico al de la cadena (o cadenas) lateral reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/00373, y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la materia agentes reticulantes adecuados, y se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con un número de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecifico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecifica F(ab')<sub>2</sub> totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecifico. El anticuerpo biespecifico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como de provocar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por medio de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el

emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

#### 7. *Anticuerpos multivalentes*

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos a los de clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetraivalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en posición amino-terminal respecto de la región Fc. En determinadas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a ocho sitios de unión a antígeno. En una de dichas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en el que las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-(X2)<sub>n</sub>-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazante flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

#### 8. *Anticuerpos de un solo dominio*

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de un solo dominio. Un anticuerpo de un solo dominio es una sola cadena polipeptídica que comprende la totalidad o parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de un solo dominio consiste en la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

#### 9. *Variantes de anticuerpos*

En algunas realizaciones, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios adecuados en la secuencia nucleotídica que codifica al anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Pueden introducirse las modificaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se produce la secuencia.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", tal como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En el presente documento, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de anticuerpos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales o distintas en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque esté predeterminado el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí esté determinada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo barrido de ala o mutagénesis al azar en el codon o región diana y se explora la actividad deseada para las inmunoglobulinas expresadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos simples o múltiples de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, ADEPT) o con un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir la medida en la que se glucosila el anticuerpo. La glucosilación de polipéptidos es generalmente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato en la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o eliminación de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que se crea o elimina una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente descritas (por ejemplo, sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también puede producirse mediante la alteración, eliminación o sustitución de uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).

En los casos donde el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado biantenarico que está unido generalmente mediante un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32. El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como una fucosa unida a GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden efectuarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes pueden tener función de ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742 y WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004). Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986). Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tales como células CHO *knockout* para el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO 2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpo con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en las que se bisecciona un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); en la patente de Estados Unidos Nº 6.602.684 (Umana et al.); y en el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); en el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y en el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

En determinadas realizaciones, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los restos). Dichas sustituciones pueden aparecer en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que tiene algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en una candidata deseable en aplicaciones donde la semivida del anticuerpo in vivo sea importante pero algunas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En determinadas realizaciones, se miden las actividades de Fc del anticuerpo para asegurarse de que

solo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (careciendo análogamente de actividad ADCC), pero que mantiene la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan FcγRNI, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRN y FcγRNI. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC en una molécula de interés se han descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de citotoxicidad (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Las determinaciones de la unión a FcRn y del aclaramiento/semivida *in vivo* también se pueden llevar a cabo usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Los cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" se proporcionan en la Tabla 1, o tal como se describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y explorarse los productos, por ejemplo, para una actividad deseada, tal como unión a antígeno mejorada, inmunogenicidad disminuida, ADCC o CDC mejoradas, etc.

TABLA 1

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

Las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden lograrse seleccionando sustituciones que afectan a (a) la estructura del armazón polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación

de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)).

- 5 (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)  
 (2) polares no cargadas: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)  
 (3) ácidas: Asp (D), Glu (E)  
 (4) básicas: Lys (K), Arg (R), His(H)

10 Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- 15 (1) hidrófobas: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;  
 (2) hidrófilas neutras: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;  
 (3) ácidas: Asp, Glu;  
 (4) básicas: His, Lys, Arg;  
 (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;  
 (6) aromáticas: Trp, Tyr, Phe.

20 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o en el resto de sitios (no conservados).

25 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación al anticuerpo parental a partir del que se generan. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se muestran a partir de partículas de fago filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de envuelta de fago (por ejemplo, el producto génico III de M13) empaquetado con cada partícula. Entonces se explora la actividad biológica de las variantes presentadas en fagos (por ejemplo, la afinidad de unión). Para identificar sitios de región hipervariables candidatos para modificación, puede efectuarse mutación de barrido (por ejemplo, de barrido de alanina) para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos a sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluyendo aquellas explicadas en el presente documento. Una vez se han generado dichas variantes, se somete el panel de variantes a exploración usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo aquellas divulgadas en el presente documento, y pueden seleccionarse las variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

45 Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitios), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

50 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo aquellas de una cisteína de bisagra.

55 De acuerdo con esta descripción y con las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos pueden, sin embargo, mantener sustancialmente las mismas características necesarias para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden efectuarse determinadas alteraciones en la región Fc que darán como resultado unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas (es decir, aumentadas o disminuidas), por ejemplo, tal como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de Estados Unidos N° 5.648.260; la patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y el documento WO 94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes en la región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que son responsables de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se han descrito en el documento

US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.551 B1, documento WO99/51642. Véase, también Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de los polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en la que la protuberancia se puede posicionar en la cavidad para promover la formación de complejos entre el primer y el segundo polipéptido de Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.731.168.

En otro aspecto más, puede ser deseable crear anticuerpos con cisteína diseñados mediante ingeniería genética, por ejemplo, "thioMAbs", en los que se han sustituido uno o más restos de un anticuerpo con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan por tanto en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos enlazantes de fármacos, tal como se describe más adelante en el presente documento. En determinadas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

#### 10. *Derivados de anticuerpos*

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de anticuerpo y restos no proteínicos que se pueden haber calentado selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañen a células normales, pero que calientan al resto no proteínico hasta una temperatura a la que se eliminan las células próximas al anticuerpo-resto no proteínico.

#### B. *Determinados métodos para producir anticuerpos*

##### 1. *Determinados métodos basados en hibridoma*

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden producirse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo et al., Hibridoma 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) en relación a hibridomas humano-humano. Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 7.189.826 en relación a la producción de anticuerpos de IgM monoclonales naturales humanos a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Para varias otras técnicas de hibridoma, véase, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las Patentes de los Estados Unidos Nos 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ilustrativo para producir anticuerpos monoclonales usando el método de hibridoma se describe a continuación. En una realización, un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos se



5 producen en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende Notch2 o un fragmento del mismo (por ejemplo, NRR de Notch2), y un adyuvante, tal como lípido A de monofosforilo (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende Notch2 o un fragmento del mismo puede prepararse usando métodos conocidos en la técnica, tales como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. El suero de los animales inmunizados se analiza en busca de anticuerpos anti-Notch2, y se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Los linfocitos de los animales que producen anticuerpos anti-Notch2 se aíslan. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

10 Entonces se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986). Pueden usarse células de mieloma que se fusionan de manera eficaz, soportan altos niveles de producción estable de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero sin limitación, líneas de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores murinos MOPC-21 y MPC-11 disponibles a través del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles a través de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. También se han descrito líneas de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

15 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma no fusionadas parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), evitando estas sustancias el crecimiento de las células deficientes en HGPRT. Preferentemente, se usan métodos de cultivo de células de hibridoma sin suero para reducir el uso de suero derivado de animal, tal como suero fetal bovino, tal como se describe, por ejemplo, en Even et al., *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

20 Se describen oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo convencionales se enriquecen con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), o con fracciones de hidrolizado de proteínas, y puede suprimirse significativamente la apoptosis mediante oligopéptidos sintéticos, compuestos de tres a seis restos de aminoácidos. Los péptidos están presentes a concentraciones milimolares o mayores.

25 El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma puede ensayarse para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a Notch2. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

30 Después de identificar células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecerse mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Goding, anteriormente citado. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecerse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para aislar proteínas de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.919.436. El método incluye usar sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el proceso de unión y preferentemente usar también pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

## 2. Determinados métodos de exploración de bibliotecas

35 Los anticuerpos de la invención pueden producirse usando bibliotecas combinatorias para explorar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica una variedad de métodos para generar bibliotecas de presentación de fagos y para explorar dichas bibliotecas en busca de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos se describen de manera general en Hoogenboom et al., en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un método para generar anticuerpos de interés es mediante el uso de una biblioteca de anticuerpos de fago tal como se describe en Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

En principio, los clones sintéticos de anticuerpos se seleccionan explorando fagotecas que contienen fagos que muestran varios fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionadas a una proteína de envuelta del fago. Dichas fagotecas se panean mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y se separan de este modo de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones que se unen se eluyen entonces del antígeno, y pueden enriquecerse adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. cualquiera de los anticuerpos de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de exploración de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y las secuencias adecuadas de la región constante (Fc) descritas en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), Volúmenes 1-3.

En determinadas realizaciones, se forma el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de ellas de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios funcionales pueden mostrarse funcionalmente en el fago, bien como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que la VH y la VL están unidas covalentemente mediante un péptido corto flexible o como fragmentos Fab, en los que se fusionan cada una a un dominio constante e interactúa no covalentemente, tal como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Tal como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican el scFv y los clones de fago que codifican el Fab se citan colectivamente como "clones de fago de Fv" o "clones de Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en fagotecas, que pueden explorarse a continuación para seleccionar clones de unión a antígeno, tal como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin exposición previa puede clonarse para proporcionar una sola fuente de anticuerpos humanos para una gran variedad de antígenos propios y no propios sin inmunización, tal como se describe por Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de forma sintética bibliotecas sin exposición previa clonando segmentos del gen V no reordenados procedentes de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencias al azar para codificar las regiones CDR3 elevadamente variables y para lograr la reorganización *in vitro* tal como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

En determinadas realizaciones, se usan fagos filamentosos para mostrar fragmentos de anticuerpo mediante fusión a la proteína de envuelta menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden mostrarse como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL se conectan en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, tal como se describe por Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde el conjunto de una estructura Fab-proteína de recubrimiento se muestra sobre la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la envuelta de tipo silvestre, por ejemplo, tal como se describe en Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos se obtienen a partir de células inmunitarias recogidas de seres humanos o de animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-Notch2 (por ejemplo, clones anti-NRR de Notch2), el sujeto se inmuniza con Notch2 (o NRR de Notch2) para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan células de bazo y/o células B circulantes u otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano sesgada en favor de clones anti-Notch2 generando una respuesta de anticuerpo anti-Notch2 en ratones transgénicos que portan un conjunto de genes de inmunoglobulina humana funcionales (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógeno) de tal forma que la inmunización con Notch2 da lugar a células B que producen anticuerpos humanos contra Notch2. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas a Notch2 puede obtenerse usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de Notch2, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía de afinidad de Notch2 o adsorción de células a Notch2 marcado con fluorocromo seguida de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Como alternativa, el uso de células de bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpos posible, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que Notch2 no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan construcciones génicas de anticuerpo, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpo no reorganizados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse a partir de una diversidad de especies animales, tales como seres humanos, ratón, ratas, lagomorfos, luprinos, caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos, y especies aviares, etc.

El ácido nucleico que codifica segmentos génicos variables de anticuerpo (incluyendo segmentos de VH y VL) se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores coincidentes con los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reorganizados tal como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), produciendo de este modo diversos repertorios génicos de V para su expresión. Los genes de V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados en el segmento J tal como se describe en Orlandi et al., (1989) y en Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder, tal como se describe en Jones et al., Biotechnol. 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos en la región constante, tal como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degeneración en los cebadores, tal como se describe en Orlandi et al., (1989) o en Sastry et al. (1989). En determinadas realizaciones, la diversidad de la biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de gen V para amplificar todos los ordenamientos de VH y VL presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmunitaria, por ejemplo, tal como se describe en el método de Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o tal como se describe en el método de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción raros en el cebador de la PCR como un marcador en un extremo, tal como se describe en Orlandi et al., (1989), o mediante amplificación PCR adicional con un cebador marcado, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reorganizados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos génicos de V. La mayoría de los segmentos génicos de VH humanos se han clonado y secuenciado (comunicado en Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y se han mapeado (comunicado en Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle de H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios génicos de VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden producirse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle de H3 largo de una sola longitud, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado los segmentos de Vk y Vλ (comunicado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para producir repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios génicos de V sintéticos, basados en una variedad de pliegues de VH y VL, y de longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos con una diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN que codifican el gen V, pueden reorganizarse los segmentos del gen V de línea germinal *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpo pueden construirse combinando repertorios génicos de VH y VL juntos de varios modos. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores se recombinan *in vitro*, por ejemplo, tal como se describe en Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). La estrategia de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto mediante la eficiencia de la transformación en *E. coli*. Los repertorios de VH y VL no expuestos previamente se clonan por separado, uno en un vector de fagémido y el otro en uno de fago. Entonces se combinan las dos bibliotecas mediante la infección con fago de bacterias que contienen fagémido, de tal forma que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca se limita solamente por el número de células presentes (aproximadamente  $10^{12}$  clones). Ambos vectores contiene señales de recombinación *in vivo* de tal forma que los genes de VH y VL se recombinan en un solo replicón y se empaquetan conjuntamente en viriones de fago. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de varios anticuerpos de buena afinidad ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^8$  M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos mediante PCR y después clonarse, por ejemplo, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). El montaje PCR también puede usarse para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más, se usa "montaje PCR en célula" para combinar genes de VH y VL en linfocitos mediante PCR y después clonar repertorios de genes ligados, tal como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas nativas (ya sean naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  M<sup>-1</sup>), pero también puede imitarse la maduración por afinidad *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de bibliotecas secundarias, tal como se describe en Winter et al., (1994), anteriormente citado. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (comunicada en Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Además, la maduración por afinidad puede efectuarse mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando cebadores de PCR que portan secuencia al azar que sobrepasa la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y explorando en busca de clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un método para

inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación en fago con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorando en busca de mayor afinidad en varias rondas de reorganización de cadena, tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.* 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente  $10^{-9}$  M o menor.

La exploración de bibliotecas puede lograrse mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, puede usarse Notch2 (o NRR de Notch2) para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresado en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en clasificación de células, o conjugarse a biotina para captura con perlas recubiertas con estreptavidina, o usarse en cualquier otro método para panear bibliotecas de presentación en fagos.

Las muestras de la fagoteca se ponen en contacto con Notch2 inmovilizado en condiciones adecuadas para unir al menos una porción de las partículas del fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se seleccionan para asemejarse a las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen mediante ácido, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o por álcalis, por ejemplo, tal como se describe en Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición con antígeno de Notch2, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una sola ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden crecerse en cultivo bacteriano y someterse a rondas de selección adicionales.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y de si pueden unirse al antígeno múltiples fragmentos de anticuerpo a un solo fago simultáneamente. Los fagos con cinéticas de disociación rápidas (y débiles afinidades de unión) pueden retenerse mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y una elevada densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza al fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece que el fago que se ha disociado vuelva a unirse. La selección de anticuerpos con cinéticas de disociación lentas (y buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación en fago monovalente, tal como se describe en Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno, tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.* 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para Notch2. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, tal como se lleva a cabo en algunas técnicas de maduración por afinidad) es posible que de lugar a muchos mutantes, la mayoría que se unen al antígeno, y unos pocos con afinidad mayor. Con Notch2 limitante, podría eliminarse de la competición fago de alta afinidad raro. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con Notch2 biotinilado en exceso, pero con Notch2 biotinilado a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para Notch2. Los fagos de unión de alta afinidad pueden capturarse entonces mediante perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan baja como dos veces a partir de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

Los clones anti-Notch2 pueden seleccionarse basándose en la actividad. En determinadas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-Notch2 que se unen a células vivas que expresan Notch2 de manera natural. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-Notch2 que bloquean la unión entre un ligando de Notch2 y Notch2, pero que no bloquean la unión entre un ligando de Notch2 y una segunda proteína. Los clones de Fv que corresponden a dichos anticuerpos anti-Notch2 pueden seleccionarse (1) aislando clones anti-Notch2 de una fagoteca, tal como se describe anteriormente, y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fago haciendo crecer la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) seleccionando Notch2 y una segunda proteína contra la que se desea actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago anti-Notch2 a Notch2 inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a Notch2 que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones de Fv de presentación en fago de la invención se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las secuencias codificantes de la cadena ligera y pesada de interés a partir de un molde de hibridoma o de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de

inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN adecuadas pueden obtenerse de Kabat et al., anteriormente citado) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como un ser humano) y después fusionado a un ADN de región constante de otra especie animal para formar secuencias codificantes para cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de longitud completa "híbridas" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" tal como se usa en el presente documento. En determinadas realizaciones, se fusiona un clon de Fv derivado de ADN de región variable humano a ADN de región constante humano para formar secuencias codificantes para cadenas pesadas y/o cadenas ligeras humanas de longitud completa o parcial.

También puede modificarse el ADN que codifica el anticuerpo anti-Notch2 derivado de un híbrido de la invención, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena ligera y pesada humana en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de híbrido (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de híbrido o de clon de Fv puede modificarse adicionalmente uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de clon de Fv o de clon de híbrido de la invención.

### 3. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Los anticuerpos también pueden producirse usando métodos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-Notch2, se aísla el ácido nucleico que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

#### a) Componente de secuencia de señal

Un anticuerpo de la invención puede producirse de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que se reconozca y procese (es decir, que se escinda por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para células procariotas que no reconocen y procesan una secuencia de señal de anticuerpo nativo, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal de procariotas seleccionada, por ejemplo, entre el grupo líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o de enterotoxina II estable al calor. Para secreción en levaduras, la secuencia de señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder de factor  $\alpha$  (incluyendo los líderes de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* de factor  $\alpha$ ), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión celular en mamífero, están disponibles las secuencias de señal de mamífero, así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

#### b) Origen de replicación

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para una diversidad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamífero (el origen de SV40 puede usarse típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

#### c) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas de complemento, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles en un medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica racemasa de D-alanina para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman de manera satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar ácido nucleico que codifica al anticuerpo, tales como DHFR, glutamina sintasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de DHFR se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, se amplifica el gen de DHFR junto con cualquier otro ácido nucleico transfectedo conjuntamente. Puede usarse una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad endógena de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células transformadas con el gen GS se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene sulfoximina de L-metionina (Msx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, se amplifica el gen de GS junto con cualquier otro ácido nucleico transfectedo conjuntamente. El sistema de selección/amplificación de GS puede usarse en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente células hospedadoras que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas conjuntamente con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen de DHFR de tipo silvestre, y otro marcador de selección, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de los Estados Unidos n° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las células de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6  $\mu$ m pueden usarse para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Como alternativa, se comunicó un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina de suero humana recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

#### d) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen generalmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente a ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas de  $\beta$ -lactamasa y promotor de lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica un anticuerpo.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25-30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión de eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras de eucariotas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

5 Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotienina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levadura se describen además en el documento EP 10 73.657. También se usan de manera ventajosa potenciadores de levadura junto con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero puede controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus de simio 40 (SV40), o de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedadora.

20 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la Patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Véase también Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) acerca de la expresión de ADNc de interferón  $\beta$  humano en 25 células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

#### e) Componente de elemento potenciador

30 La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta normalmente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$  fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el 35 potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) acerca de elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector a una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

#### 40 f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células eucariotas (levaduras, hongos, de insecto, vegetales, animales, humanas, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están fácilmente disponibles a 45 partir de las regiones 5' y en ocasiones 3' no traducidas de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en este.

#### 50 g) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento son células procariotas, levaduras, o células eucariotas superiores, tal como se describe anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos y Gram-positivos, por 55 ejemplo, enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* 60 B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Los anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpo, y fragmentos de anticuerpo pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que en sí misma muestra 65 efectividad en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida en circulación más larga. La producción en *E. coli* es más rápida y mayor eficiente en costes. Para la expresión de

fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.648.237 (Carter et al.), el documento U.S. 5.789.199 (Joly et al.), el documento U.S. 5.840.523 (Simmons et al.), que describe la región de inicio de la transcripción (TIR) y secuencias de señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, por ejemplo, columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de manera similar al proceso para purificar anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de procariontes, los microbios eucariotes, tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores adecuados para clonación o expresión para vectores que codifican anticuerpos. La *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadero, es la más usada entre los microorganismos hospedadores de eucariotes inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están disponibles de manera común y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, hospedadores de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyopocladium*, y *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que discute el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Pueden seleccionarse determinadas cepas de hongos y levaduras en las que las rutas de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross et al., anteriormente citado.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (vertebrados e invertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas a partir de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles una variedad de cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como los virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, especialmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de planta de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate lenteja de agua (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*), y tabaco también pueden usarse como hospedadores. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados pueden usarse como hospedadores, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea celular de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea celular de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas celulares de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>r</sup> (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 255-268.

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea necesario para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

#### h) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las



células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Solicitud de Patente de los Estados Unidos, 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco de GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede también introducirse en concentraciones adecuadas que serán conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

#### i) Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, y en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos en partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al. Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares pueden retirarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse anticuerpos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, encontrándose la cromatografía de afinidad entre una de las etapas de purificación típicamente preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , o  $\gamma 4$  (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para  $\gamma 3$  humana (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesado más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C<sub>H</sub>3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE, y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de una etapa (o etapas) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, efectuada preferentemente a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

En general, están bien establecidas en la técnica varias metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayos y en la clínica, coherentes con las metodologías anteriormente descritas y/o según se consideren adecuadas por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

#### C. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados (citados de manera intercambiable como "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los inmunoconjugados se han usado para la administración local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que eliminan o inhiben el crecimiento o proliferación de células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opinión in Pharmacology 5:543-549; Wu et al., (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; Patente de los Estados Unidos N° 4.975.278). Los inmunoconjugados permiten la

administración dirigida de un resto de fármaco a un tumor, y la acumulación intracelular en este, donde la administración sistémica de fármacos no conjugados pueda dar como resultado niveles no aceptables de toxicidad para células normales así como para las células tumorales que se quieren eliminar (Baldwin et al., Lancet (15 de marzo de 1986) págs. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera et al., eds) págs. 475-506. Se han comunicado tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina de la difteria, toxinas de plantas, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al., (2000) J. Nat. Cancer Inset. 92 (19): 11573-1581; Mandler et al., (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al., (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliceamicina (Lode et al., (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión a ADN, o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan a anticuerpos grandes o a ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal de IgG1 kappa dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y un radioisótopo de  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$  unido mediante un quelante enlazante de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma de células B no Hodgkin (NHL), la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo huCD33 unido a caliceamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patentes de Estados Unidos N° 4970198, 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC242 unido a través del enlazante disulfuro SPP al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, ha pasado a ensayos de Fase II para el tratamiento de cáncer que expresan CanAg, tales como de cánceres de colon, pancreáticos, gástricos, y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en neoplasias hematológicas) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnol. 21 (7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En determinadas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, más arriba). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Hay disponibles una serie de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , y  $^{186}\text{Re}$ . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se producen usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoi) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, tal como se describe en Vitetta et al, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliceamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, y tricotecenos, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

#### 1. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos N° 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.137.230, 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos de fármaco de maitansinoides son restos de fármacos atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco ya que son: (i) relativamente accesibles para prepararlos mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos fermentados, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante enlazantes no disulfuro a anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra una diversidad de líneas celulares tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para producir los mismos, y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se observó que el conjugado era elevadamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo *in vivo* de crecimiento tumoral. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazante disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie por célula. El conjugado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que pudo aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica menor en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciaría la citotoxicidad frente al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 y en las demás patentes y publicaciones no de patente citadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

Se conocen muchos grupos de enlace en la técnica para producir conjugados de anticuerpo-maitansinol, incluyendo, por ejemplo, aquellos divulgados en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 234 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2005/016993 A1, cuyas divulgaciones se han incorporado expresamente al presente documento por referencia. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazante SMCC pueden prepararse tal como se divulga en el documento US 2005/016993 A1. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas, o grupos lábiles a esterasas, tal como se divulgan en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Los grupos enlazantes adicionales se describen e ilustran en el presente documento.

Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridiliditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridiliditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiliditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazante puede unirse a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y en la posición C-20 que tiene un

grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

## 2. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolastatina, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos N° 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis de GTP, y con la división nuclear y celular (Woyke et al., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatinas o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N-terminal (amino) o del extremo C-terminal (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones ejemplares de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal DE y DF, divulgados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", N° de Serie de Estados Unidos 10/983.340, presentado el 5 de nov. de 2004.

Típicamente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schroder y K. Lübke, "The Peptides", Volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármacos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: el documento US 5635483; el documento US 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; and Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", N° de Serie de Estados Unidos 10/983.340, presentado el 5 de nov. de 2004 (que divulgan, por ejemplo, enlazantes y métodos para preparar compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazantes).

## 3. Caliceamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliceamicina. La familia de antibióticos de caliceamicina es capaz de producir rupturas en el ADN bicatenario a concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de caliceamicina, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliceamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación,  $\gamma$ 1I,  $\alpha$ 2I,  $\alpha$ 3I, N-acetil- $\gamma$ 1I, PSAG y  $\theta$ 1I (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos de American Cyanamid anteriormente mencionadas). Otro fármaco antitumoral al que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliceamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

## 4. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos N° 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN, tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo elevadamente radioactivo. Está disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  e isótopos radiactivos de Lu; Cuando se usa el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo  $^{123}\text{I}$ , o un marcador de espín para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

(también conocido como obtención de imágenes por resonancia magnética, IMR), tal como de nuevo yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13 nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los marcadores radioactivos u otros puede incorporarse en el conjugado mediante modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como  $^{99m}\text{Tc}$  o  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  y  $^{111}\text{In}$  puede unirse mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al., (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe detalladamente otros métodos.

Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, tal como se describe en Vitetta et al, Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazante puede ser un "enlazante escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico a la célula. Por ejemplo, se puede utilizar una molécula enlazadora lábil en medio ácido, una molécula enlazadora sensible a peptidasa, una molécula enlazadora fotolábil, una molécula enlazadora que contiene dimetilo o disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos nº 5.208.020).

Los compuestos contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, a través de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

##### 5. Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazante (L). La Fórmula I de ADC puede prepararse mediante varias rutas, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos para los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazante bivalente, para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazante bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.

##### Ab-(L-D)p I

El enlazante puede estar compuesto de uno o más componentes enlazantes. Los componentes enlazantes ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloicarbonylo ("PAB"), 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC"), y (4-yodo-acetil)amidobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazantes adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", N° de Serie de Estados Unidos 10/983.340, presentado el 5 de nov. de 2004.

En algunas realizaciones, el enlazante puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes enlazantes de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ilustrativos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ilustrativos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un enlazante de aminoácido incluyen aquellos de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes enlazantes de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en cuanto a su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino del azúcar donde se glucosila el anticuerpo. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos o restos enlazantes y reactivos enlazantes

incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupo maleimido. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazantes mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará entonces, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro, o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco también pueden producirse mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco enlazante. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazantes o restos de fármacos. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos adecuados sobre el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen restos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghergan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento US 5362852). Se puede hacer reaccionar dicho aldehído con un resto de fármaco o nucleófilo enlazante.

Del mismo modo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazantes y reactivos enlazantes incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupo maleimido.

Como alternativa, puede producirse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La sección de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado bien adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazante que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-direccionamiento al tumor en administrándose el conjugado de anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente eliminador y la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

## D. Métodos

### 1. Métodos diagnósticos y métodos de detección

En un aspecto, los anticuerpos de la invención son útiles para detectar la presencia de Notch2 en una muestra biológica. El término "detectar" tal como se utiliza en el presente documento abarca la detección cuantitativa y cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido canceroso.

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de Notch2 en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-Notch2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-NRR de Notch2) en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-Notch2 a Notch2, y detectar si se forma el complejo entre el anticuerpo anti-Notch2 y Notch2.

En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión aumentada de Notch2. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-Notch2; determinar el nivel de expresión (bien cuantitativa o cualitativamente) de Notch2 en la célula de ensayo detectando la unión del anticuerpo anti-Notch2 a Notch2; y comparar el nivel de expresión de Notch2 de la célula de ensayo con el nivel de expresión de Notch2 en una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo, o una célula que expresa Notch2 a niveles comparables con dicha célula normal, o un nivel medio de expresión entre múltiples células de control), en el que un nivel mayor de expresión de Notch2 por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con la expresión aumentada de Notch2. En determinadas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo que se sospecha que padece un trastorno asociado con la expresión aumentada de Notch2. En determinadas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

Los trastornos ilustrativos que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen cáncer, por ejemplo, neoplasias de células B, melanoma, neoplasias de células T (por ejemplo, T-ALL), cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cuello de útero, cáncer de colon, y cáncer pancreático.

5 Pueden usarse otros métodos determinados para detectar la unión de anticuerpos a Notch2. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígeno que se conocen bien en la técnica, tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunsorbente asociado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de proteína A, e inmunohistoquímica (IHC).

10 En determinadas realizaciones, los anticuerpos están marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, densos a electrones, quimioluminiscentes, y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

25 En determinadas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La inmovilización puede conllevar separar un anticuerpo anti-Notch2 de cualquier Notch2 que permanezca libre en solución. Esto se logra convencionalmente insolubilizando el anticuerpo anti-Notch2 antes del procedimiento de ensayo, tal como mediante adsorción en una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., documento U.S. 3.720.760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación de glutaraldehído), o insolubilizando el anticuerpo anti-Notch2 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-Notch2 y Notch2, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

30 Se entiende que cualquiera de las realizaciones anteriores de diagnóstico o detección puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-Notch2.

## 2. Métodos terapéuticos

35 Un anticuerpo de la invención puede usarse en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*. En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la actividad de Notch2, es decir, la señalización de Notch2, in vivo o in vitro. El método comprende exponer a una célula a un anticuerpo anti-NRR de Notch2 de la invención en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a Notch2. En determinadas realizaciones, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula B cancerosa o una célula de melanoma. En una realización, puede usarse un anticuerpo anti-NRR de Notch2 de la invención para inhibir la actividad de Notch2, comprendiendo el método exponer a Notch2 a un anticuerpo anti-NRR de Notch2 de la invención de tal forma que se inhiba la actividad de Notch2.

45 Puede usarse un anticuerpo anti-NRR de Notch2, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos asociados con la expresión y/o actividad de Notch2, por ejemplo, trastornos asociados con la expresión o actividad aumentada de Notch2, o trastornos en los que la expresión o actividad de Notch2 contribuye al estado patológico. Un "trastorno asociado con la expresión o actividad aumentada de Notch2" se refiere a un trastorno en el que la expresión o actividad de Notch2 es significativamente más alta de lo normal.

50 En un aspecto, se usa un anticuerpo de la invención para tratar o prevenir el cáncer, por ejemplo, neoplasias de células B, melanoma, neoplasias de células T (por ejemplo, T-ALL), cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cuello de útero, cáncer de colon, y cáncer pancreático. En determinadas realizaciones, se usa un anticuerpo anti-NRR de Notch2 para tratar un cáncer, tal como cáncer de mama, una neoplasia de células B o melanoma.

55 En un aspecto adicional, se usa un anticuerpo de la invención para tratar o prevenir un cáncer, específicamente, un tumor sólido que contiene células madre de cáncer. Las células madre de cáncer son capaces de proliferar para dar lugar a células madre de cáncer adicionales, así como otras poblaciones celulares tumorales. Véase Al-Hajj et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 100: 3983-3988 (2003). Se cree que las células madre de cáncer contribuyen a la recurrencia de los cánceres y a la resistencia de los cánceres a las terapias farmacológicas. Los receptores Notch se han identificado como marcadores de células madre de cáncer y como dianas para eliminar las células madre de cáncer responsables de la formación y recurrencia de los tumores sólidos. Véase el documento WO 2008/091641. Los tumores sólidos incluyen, pero sin limitación, cánceres de mama, de colon, pancreáticos, de próstata, de pulmón, de cabeza y cuello, rectales, y colorrectales.

65 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un cáncer que comprenden administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. En determinadas realizaciones, un método para tratar

un cáncer comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, tal como aquellos que se proporcionan más adelante.

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar tanto solos como combinados con otras composiciones en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicional. En determinadas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-Notch1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-NRR de Notch1) con un agente terapéutico adicional que inhibe o reduce la diferenciación alterada de células intestinales que de otro se induciría por dicho anticuerpo anti-Notch1. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional dexametasona o tamoxifeno. Dicha terapia combinada puede ser útil, por ejemplo, para tratar trastornos angiogénicos, incluyendo la angiogénesis asociada al tumor, y el cáncer. En determinadas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-Notch2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-NRR de Notch2) con un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente quimioterapéutico. Dicha terapia combinada puede ser útil, por ejemplo, para tratar el cáncer, tal como neoplasias de células B y melanomas.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administrarse por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede tener lugar antes de, de manera simultánea, y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar combinados con radioterapia.

En un aspecto, al menos parte de los anticuerpos de la invención pueden unirse a Notch2 de especies distintas de la humana. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para unirse a Notch2, por ejemplo, en un cultivo de células de mamífero que expresan Notch2 endógeno o recombinante, en seres humanos, o en otros mamíferos que tienen un Notch2 con el que un anticuerpo de la invención reacciona de manera cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, títí común, cynomolgo y monos rhesus, cerdos, ratas, o ratones).

En una realización, un anticuerpo de la invención se usa en un método para unirse a Notch2 en un individuo que padece un trastorno asociado con la expresión y/o actividad aumentada de Notch2, comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo, de tal forma que se une a Notch2 en el individuo. En una realización, el Notch2 es Notch2 humano, y el individuo es un ser humano. Como alternativa, el individuo puede ser un mamífero que expresa Notch2 al que se une un anticuerpo de la invención. Además, el individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido Notch2 (por ejemplo, mediante administración de Notch2 o mediante expresión de un transgén que codifica Notch2).

Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un ser humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa Notch2 con el que el anticuerpo reacciona de manera cruzada (por ejemplo, un primate, cerdos, ratas, o ratones) con fines veterinarios o como modelo animal para una enfermedad humana. En referencia a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayando dosificaciones y duraciones de la administración).

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de manera adecuada mediante infusión pulsada, particularmente con dosis en disminución del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede tenerse en consideración en la preparación y administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, determinadas realizaciones de la invención proporcionan que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se introduzcan en la célula donde en el sitio donde se localiza la diana de unión. En una realización, un anticuerpo de la invención puede expresarse intracelularmente como un intracuerpo. El término "intracuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se expresa intracelularmente y que es capaz de unirse selectivamente a una molécula diana, tal como se describen, por ejemplo, en Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); Patentes de los Estados Unidos con números 6.004.940 y 6.329.173, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2003/0104402, y Publicación PCT N° WO 2003/077945. Véase también, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996, que se refiere al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

La expresión intracelular de un intracuerpo puede llevarse a cabo introduciendo un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o la porción de unión a antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y de las señales secretoras normalmente asociadas con el gen que codifica al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) en una célula diana. Pueden administrarse uno o más ácidos nucleicos que codifican la totalidad o una porción de un anticuerpo de la invención a una célula diana, de tal forma que se expresan uno o más intracuerpos que son capaces



de unirse a un polipéptido diana intracelular y modular la actividad del polipéptido diana. Puede usarse cualquier método convencional para introducir ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, y transfección con vectores retrovirales, adenovirales, virales adeno-asociados y de vaccinia que portan el ácido nucleico de interés.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) puede introducirse en las células de un paciente mediante métodos *in vivo* y *ex vivo*. En un ejemplo de administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente al paciente, por ejemplo, en el sitio donde se necesita la intervención terapéutica. En un ejemplo de administración *in vivo* adicional, el ácido nucleico se introduce en una célula usando transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simple, o virus adeno-asociados) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípido del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de determinados protocolos de producción de genes y de terapia génica, véase Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992), y el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en este. En un ejemplo de tratamiento *ex vivo*, se retiran las células de un paciente, se introduce ácido nucleico en esas células aisladas, y las células modificadas se administran al paciente bien directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Un vector usado de manera común para la administración *ex vivo* de un ácido nucleico es un vector retroviral.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos internalizantes. Los anticuerpos pueden poseer determinadas características que potencian la administración de anticuerpos a las células, o pueden modificarse para poseer dichas características. Las técnicas para lograr esto se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se sabe que la cationización de un anticuerpo facilita su captación al interior de las células (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.703.019). También se pueden usar lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo al interior de las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, puede ser ventajoso el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente a la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología del ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

La entrada de los anticuerpos a las células diana puede potenciarse mediante otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, algunas secuencias, tales como aquellas derivadas de Tat de VIH o la proteína de homeodominio de *Antennapedia* son capaces de dirigir la captación eficiente de proteínas heterólogas a través de membranas celulares. Véase, por ejemplo, Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96:4325-4329.

Cuando la diana de unión de un anticuerpo está localizada en el cerebro, determinadas realizaciones de la invención proporcionan que el anticuerpo atraviese la barrera hematoencefálica. Existen varias estrategias conocidas en la técnica para transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y métodos basados en receptor y canales.

Los métodos físicos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, esquivar completamente la barrera hematoencefálica, o crear aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de elusión incluyen, pero sin limitación, inyección directa al cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et al., *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), administración potenciada por infusión intersticial/convección (véase, por ejemplo, Bobo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994)), e implantar un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos (véase, por ejemplo, publicación de patente de los Estados Unidos N° 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Volúmenes 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización mediante por ejemplo, bradiquinina o permeabilizante A-7 (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos con números 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que atraviesan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense con número 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsular el anticuerpo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera sangre-cerebro (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20020025313), y recubriendo el anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud estadounidense con número 20040204354) o la apolipoproteína E (véase por ejemplo, la publicación de la solicitud estadounidense con número 20040131692).

Los métodos basados en células para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica implican diseñar por ingeniería genética células progenitoras neurales (NPC) para que expresen el anticuerpo de interés y después implantar las células madre en el cerebro del individuo que se va a tratar. Véase Behrstock et al. (2005) *Gene Ther.* 15 de diciembre de 2005, avance online de la publicación (que comunica que los NPC diseñados por ingeniería

genética para expresar el factor neurotrófico GDNF reduce los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantan en cerebros de modelos de roedor y primate).

Los métodos basados en receptor y canales para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, el uso de bloqueantes de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro (véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos con números 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); la activación de canales de potasio (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2005/0089473), la inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2003/0073713); revestir anticuerpos con una transferrina y modular la actividad del uno o más receptores de transferrina (véase por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2003/0129186), y cationizando los anticuerpos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.004.697).

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán, y administrarán de una forma consistente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios. El anticuerpo no necesariamente, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como las descritas en el presente documento, o a aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es adecuada.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros uno más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis inicial posible para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento será generalmente sostenido hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se puede administrar al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis inicial más elevada, seguida por una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación ilustrativa comprende administrar una dosis inicial de carga de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis semanal de mantenimiento de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-Notch2.

### 3. Ensayos

Los anticuerpos anti-NRR de Notch2 de la invención pueden caracterizarse según sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

#### a) Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-Notch2 (por ejemplo, anticuerpos anti-NRR de Notch2) que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, inhibición o reducción de la actividad de Notch2, por ejemplo, de la señalización de Notch2. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinadas realizaciones, se ensaya un anticuerpo anti-NRR de Notch2 de la invención para su capacidad para inhibir la generación de células B de zona marginal. Se proporciona un ensayo ilustrativo en los Ejemplos. En otras realizaciones determinadas, se ensaya la capacidad de un anticuerpo de la invención para inhibir la expresión de un gen indicador que responde a la señalización de Notch2. Se proporciona un ensayo ilustrativo en los Ejemplos.

b) Ensayos de unión y otros ensayos

5 En un aspecto, se ensaya un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, transferencia de Western, etc. En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que compite con un anticuerpo de la invención. En una realización, un anticuerpo compite con el Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, o el Anticuerpo D-3 por la unión a Notch2. En una de dichas realizaciones, un anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o un epítipo conformacional) al que se une el Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, o Anticuerpo D-3. En otra realización, un anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) al que se une un anti-NRR1 tal como se describe en el Ejemplo B(5), es decir, un epítipo que comprende dominios LNR-A, LNR-B y HD-C de NRR de Notch1. Los ensayos competitivos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ensayos rutinarios, tales como aquellos proporcionados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Los métodos ilustrativos detallados para mapear un epítipo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos "se unen al mismo epítipo" si cada uno bloquea la unión del otro en un 50 % o más.

20 En un ensayo de competición ejemplar, se incuban NRR de Notch2 en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a NRR de Notch2 (por ejemplo, Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, o Anticuerpo D-3) y un segundo anticuerpo que se esté ensayando para su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a NRR de Notch2. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuban NRR de Notch2 inmovilizados en una solución que comprende al primer anticuerpo marcado pero no al segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a NRR de Notch2, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el NRR de Notch2 inmovilizado. Si la cantidad del marcador asociado con el NRR de Notch2 inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo en relación a la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión a NRR de Notch2.

30 En un aspecto, los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse adicionalmente mediante una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión de papaína.

35 Se entiende que cualquiera de los ensayos anteriores puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-NRR de Notch2.

E. Artículos de fabricación

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo de la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

IV. Ejemplos

60 Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

A. Materiales y métodos

65 1. *Generación de anticuerpos anti-NRR de Notch2*

Clasificación de bibliotecas y selección para identificar anticuerpos anti-NRR de Notch2

5 Se usaron para el paneo bibliotecas de anticuerpos con diversidades sintéticas en las regiones determinantes de la complementariedad seleccionadas (H1, H2, H3, L3), que imitan la diversidad natural del repertorio de IgG humano. Se mostraron bivalentemente fragmentos Fab sobre la superficie de partículas de bacteriófago M13. (Véase Lee et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)). Los fragmentos de NRR de Notch2 se expresaron como proteínas secretadas fusionadas a marcadores de epítipo (FLAG o 6xHis) usando el sistema de vector de expresión de baculovirus o células 293T, purificadas a una pureza de >90 % usando cromatografía de afinidad y se ensayaron para ausencia de agregación usando dispersión de luz. Las secuencias de los antígenos de NRR de Notch2 fueron las siguientes:

FLAG-NRR-Notch2-humano-6xHis:

15 KDDDDKSGDVGCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPGFGSARCQSSCGQVKCRKGEQCVHTASGPRCF  
CPSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYYSCQCAPPFSGSRCELYTAPPSTPPATCLSQYCADKARDGVC  
DEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSPLPCWDYINNQCDELNTVECLFDNFECQGNSTCKYDKYCAD  
HFKDNHCNQQGCNSEECGWDGLDCAADQPENLAEGTLVIVVLMPEQLLQDARSFLRALGTLHTNLRKRDQSG  
ELMVYPYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEVEVAGSKVFLEIDNRQCVQSDSDHCFKNTDAAAALLASHAIQGT  
20 SYPLVSVVSESLTPERTEFGLVPRGSGHHHHH (SEC ID N°: 73)

NRR de Notch2 de ratón-FLAG:

25 ADVCPQKPCLNNGGTCAVASNMPDGFICRCPGFGSARCQSSCGQVKCRRGEQCIHTDSGPRCFCLNPKDCES  
GCASNPCQHGGTCYPQRQPPHYSCRCPPSFGGSHCELYTAPTSTPPATCQSQYCADKARDGICDEACNSHAC  
QWDGGDCSLTMEDPWANCTST

30 LRCWEYINNQCDEQCNTAECLFDNFECQRNSKTCKYDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQPEN  
LAEGTLIIVVLLPPEQLLQDSRSFLRALGTLHTNLRKQDSQGALMVYPYFGEKSAAMKKQKMTTRRSLPEEQE  
QEVIGSKIFLEIDNRQCVQSDSDQCFKNTDAAAALLASHAIQGTLSYPLVSVVFSELESPRNARRAGSGDYKDDD  
DKENLYFQ (SEC ID N°: 74)

35 Se recubrieron inmunoplasmas Nunc de 96 pocillos Maxisorp durante toda la noche a 4°C con antígeno diana (10 µg/ml) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón de bloque de fago PBST (suero salino tamponado con fosfato (PBS) y albúmina de suero bovino al 1 % (p/v) (BSA) y Tween 20 al 0,05 % (v/v)). Se añadieron fagotecas de VH de anticuerpo (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004) y de VH/VL (véase Liang et al., J. Mol. Biol. 366: 815-829, 2007) a placas de antígeno por separado y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente las placas recubiertas con antígeno se lavaron diez veces con PBT (PBS con Tween 20 al 0,05 %), y los fagos unidos se eluyeron con HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 minutos y se neutralizaron con un volumen igual de base Tris 1 M (pH 7,5). El fago recuperado se amplificó en células de *E. coli* XL-1 Blue. Durante los ciclos posteriores de selección, la incubación del fago de anticuerpo con las placas recubiertas de antígeno se redujo a 2-3 horas, y se aumentó gradualmente la rigurosidad de los lavados de placas.

45 Después de 4 ciclos de paneo, se observó un enriquecimiento significativo. Se tomaron 96 clones cada uno de una clasificación de biblioteca de VH y VH/VL para determinar si se unían específicamente a NRR de Notch2 tanto humano como murino. Las regiones variables de estos clones se secuenciaron mediante PCR para identificar clones de secuencia única.

50 Las afinidades de los anticuerpos de fago se clasificaron usando ELISA de competición en puntos. Los valores de  $CI_{50}$  de fagos se determinaron además usando ELISA de unión de fago competitivo. Los anticuerpos de fago únicos que se unían a NRR de Notch2 tanto humano como murino se seleccionaron y reformatearon a IgG de longitud completa para su evaluación en un ensayo celular *in vitro*.

55 Los clones de interés se reformatearon en IgG clonando las regiones  $V_L$  y  $V_H$  de los clones individuales en los vectores LPG3 y LPG4 respectivamente, expresándolos transitoriamente en células CHO de mamífero, y purificándolos con una columna de proteína A.

Bibliotecas de construcción para la mejora de la afinidad del Anticuerpo D

60 El fagémido pW0703 (derivado del fagémido pV0350-2b (Lee et al., J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004)) que muestra Fab monovalente sobre la superficie del bacteriófago M13) sirvió como molde de la biblioteca para injertar dominios variables de cadena ligera ( $V_L$ ) y pesada ( $V_H$ ) del Anticuerpo D a partir de la biblioteca de VH/VL para la maduración por afinidad. Entonces se incorporaron los codones de terminación en la CDR-L3 del molde de biblioteca. Se usó una estrategia de aleatorización débil para la maduración por afinidad, lo que introdujo una tasa de mutación de aproximadamente el 50 % en las posiciones seleccionadas usando una estrategia de nucleótido envenenado con mezclas de bases de 70-10-10-10 que favorecen los nucleótidos de tipo silvestre (Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry 37:1233-1251 (1994)). Los restos específicos en las posiciones 28-32 de CDR-L1, 50 y 53-55 de CDR-L2,

91-94 y 96 de CDR-L3, 28-35 de CDR-H1, 50-58 de CDR-H2, 95-100 de CDR-H3, se usaron como diana. También se construyeron tres bibliotecas diferentes con combinaciones de bucles de CDR débilmente aleatorizados, L1/L2/L3, L3/H1/H2 y L3/H3.

#### 5 Estrategia de clasificación de fagos para generar mejora de la afinidad

Para la selección de la mejora de la afinidad, se sometieron las fagotecas a clasificación en placa para la primera ronda, seguidas de cinco rondas de clasificación en solución. Las bibliotecas se clasificaron contra NRR de Notch2 humano y murino por separado. En la primera ronda de clasificación en placa, se clasificaron tres bibliotecas contra una placa recubierta diana (placa NUNC Maxisorp) por separado con la entrada de fago a aproximadamente 3 D.O./ml en BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la siguiente ronda de clasificación en solución, se incubaron 1 D.O./ml de fago propagado a partir de la primera ronda de clasificación en placa con proteína diana biotinilada 50 nM (la concentración se basa en el valor de la CI50 del clon de fago parental) en 100 ml de tampón que contenía Superblock al 1 % (Pierce Biotechnology) y Tween 20 al 0,05 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó adicionalmente 10 X con Superblock al 1 %, y se aplicaron 100 µl/pocillo pocillos recubiertos con neutravidina (5 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave para capturar fago unido a la diana biotinilada. Los pocillos se lavaron entonces con PBS-Tween 20 al 0,05 % diez veces. Para determinar la unión de fondo, los pocillos de control que contenían fago con dianas que no estaban biotiniladas se capturaron en placas recubiertas con neutravidina. El fago unido se eluyó con HCl 0,1 N durante 20 minutos, se neutralizaron con un volumen 1/10 de Tris 1M pH 11, se titularon, y se propagaron para la ronda siguiente. A continuación, se llevaron cuatro rondas más de clasificación en solución junto con dos métodos para aumentar la rigurosidad de la selección. El primero de estos es una selección de tasa de asociación disminuyendo la concentración de proteína diana biotinilada de 10 nM a 0,5 nM, y el segundo es para selección por tasa de disociación añadiendo cantidades en exceso de proteína diana no biotinilada (100-500 veces más) para eliminar por competición a los que se unen más débilmente a temperatura ambiente. También, se disminuyó la entrada de fago (0,1-0,5 D.O./ml) para disminuir la unión de fondo de fago.

#### ELISA de exploración de afinidad de alto rendimiento (competición en un solo punto)

30 Se recogieron las colonias de la sexta ronda de clasificación y se crecieron durante toda la noche a 37°C en 500 µl/pocillo de medio 2YT con carbenicilina 50 µg/ml y 1E10/ml KO7 en una placa de 96 pocillos (Falcon). De la misma placa, se recogió una colonia de XL-1 infectadas con fago parental como control. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp con 100 µl/pocillo de proteína NRR de Notch2 humana y murina (1 µg/ml) por separación en PBS a 4°C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 65 µl de BSA al 1 % durante 30 minutos y 40 µl de Tween 20 al 1 % durante otros 30 minutos.

El sobrenadante de fagos se diluyó a 1:5 en tampón de ELISA (ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas) (PBS con BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,05 %) con o sin proteína diana 10 nM en un volumen total de 100 µl y se incubó durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en una placa F (NUNC). 75 µl de la mezcla con o sin proteína diana se transfirieron de un lado a otro a las placas recubiertas con proteína diana. La placa se agitó suavemente durante 15 minutos para permitir la captura de fago no unido a la placa recubierta con proteína diana. La placa se lavó al menos cinco veces con PBS-Tween 20 al 0,05 %. La unión se cuantificó mediante anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,05 % al menos cinco veces. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de una relación 1:1 de sustrato de peroxidasa de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y solución de peroxidasa B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) a los pocillos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido fosfórico 1 M (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La DO (densidad óptica) del color amarillo en cada placa se determinó usando un lector de placas de ELISA convencional a 450 nm. La reducción de la DO (%) se calculó mediante la siguiente ecuación.

Reducción de DO<sub>450nm</sub> (%) = [(DO<sub>450nm</sub> de pocillos con competidos) / (DO<sub>450nm</sub> de pocillos sin competidor)] \*100

55 En comparación con la reducción de DO<sub>450nm</sub> (%) del pocillo del fago parental (100 %), los clones que tenían la reducción de DO<sub>450nm</sub> (%) menor del 50 % para la diana tanto humana como murina se recogieron para análisis de secuencia. Se seleccionaron clones únicos para preparación de fagos para determinar la afinidad de unión (CI50 de fago) contra NRR de Notch2 tanto de humano como murino mediante comparación con clones parentales. Los clones con la mejora de la afinidad más alta se reformatearon en IgG1 humana y se expresaron en células de mamífero.

#### 60 Caracterización de anticuerpos anti-NRR de Notch2 (Biacore)

Las afinidades de unión de los anticuerpos anti-NRR de Notch2 se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SRP) usando un instrumento Biacore™-3000. Se capturaron las IgG anti-NRR de Notch2 mediante IgG de ratón anti-humano recubierta sobre la microplaca sensora CM5 para lograr aproximadamente 200 unidades de respuesta (UR). Para las medidas cinéticas se inyectaron diluciones en serie de dos veces de NRR de Notch2 (3,9 nM a 500 nM) en tampón PBT (PBS con Tween 20 al 0,05 %) a 25 °C con un caudal de 30 µl/min. Las velocidades de

asociación ( $k_{on}$ ) y las velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) se calcularon usando un modelo de unión simple de uno a uno de Langmuir (Programa informático BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se calculó como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ .

5     2.     *Generación de anticuerpos anti-NRR de Notch1*

La generación y caracterización de determinados anticuerpos anti-NRR de Notch1 se ha descrito anteriormente. Véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2009/0081238 A1.

10    3.     *ELISA*

15    Ser usó anticuerpo anti-FLAG para capturar proteína NRR marcada con FLAG de todos los cuatro receptores de Notch en una placa de unión de paredes negras (Greiner). El anticuerpo de NRR y los anticuerpos de control de E25 se unieron a las proteínas NRR y se eliminaron por lavado con PBS. Se usó un anticuerpo secundario anti-humano conjugado a fosfatasa alcalina (H+L) (Jackson ImmunoResearch) para detectar anti-NRR y E25 unido. El anticuerpo secundario no unido se eliminó por lavado y se detectó AP con sustrato PNPP (Pierce).

20    4.     *FACS*

20    Se produjeron plásmidos de expresión en los que el dominio extracelular de Notch1 o Notch2 y los dominios transmembrana se marcaron con myc en el extremo N-terminal y se expresaron bajo el control de un elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) cadena arriba de un promotor temprano inmediato mínimo de CMV. Estos plásmidos se transfectaron de manera estable en células CHO-K1 (Clonotech), diseñadas para expresar una proteína transactivadora en presencia de doxiciclina que se une a y activa al TRE en el plásmido transfectado. Las células se trataron con 1 mg/ml de doxiciclina o vehículo durante 48 horas, y después se tiñeron con anticuerpos anti-NRR, anti-myc (9E10, Millipore) o E25 de control y con anticuerpos secundarios de cabra anti-humano Alexa 488 o Alexa 647 (Invitrogen). Después de la tinción, se pasaron las células por una máquina FACScalibur (BD Biosciences) y se recogieron 15000 eventos y los intervalos de clasificación se representaron para evaluar poblaciones teñidas positiva y negativamente.

30

5.     *Ensayo indicador de Notch*

35    Se cotransfectaron células NIH-3T3 transfectadas establemente con Notch1 o transfectadas transitoriamente con plásmidos que contenían otros receptores de Notch con un indicador de luciferasa de luciérnaga de respuesta a Notch TP-1 (12X CSL) y un indicador de luciferasa de renilla constitutivamente activo (pRL-CMV, Promega) para controlar la eficacia de la transfección. Se deja que las células se recuperen de la transfección durante entre 6 horas y toda una noche. Los tratamientos de anticuerpos y células NIH-3T3 transfectadas de manera estable se usan para estimular a las células receptoras. Después de 20 horas, se miden la luciferasa de luciérnaga y de renilla con un sistema de ensayo de luciferasa Dual Glo (Promega). Se analizaron ocho replicados para condición dividiendo la señal de luciérnaga entre la señal de renilla para controlar la eficacia de la transfección. Se calcularon la media y la desviación estándar y se normalizaron los valores a los valores calculados para co-cultivo estimulado con células NIH-3T3 sin ligando transfectado.

40

45    6.     *Mapeo de epítomos*

45    Se diseñaron secuencias de NRR de Notch1 y Notch2 con sitios de restricción únicos en las uniones entre los cinco dominios del NRR - LNR-A; LNR-B; LNR-C; HD-N; y HD-C - y se produjeron mediante tecnología Blue Heron (Bothell, WA). Intercambiando varios dominios entre las dos secuencias sintéticas, usando los sitios de restricción diseñados, se generaron proteínas NRR quiméricas. Los clones quiméricos se ensamblaron en un vector pUC19 modificado y se transfectaron a un vector que contenía SEAP, pCSC.AP, para su expresión. Se produjeron proteínas NRR marcadas con AP mediante transfección de células 293T. Después de 72 horas de cultivo, se recogió el medio condicionado, se aclaró por centrifugación, y se ensayó la actividad de AP usando el sistema Phospha-Ligh (Applied Biosystems, Bedford, MA). Se normalizó la actividad de AP en cada muestra y se llevó a cabo un ELISA para ensayar la capacidad de  $\alpha$ -NRR1 o  $\alpha$ -NRR2 para unirse a las proteínas NRR quiméricas. El ELISA se llevó a cabo del modo siguiente: se capturó  $\alpha$ -NRR1 o  $\alpha$ -NRR2 por un anticuerpo anti-Fc unido a placa en formato de 96 pocillos y se incubó con el medio condicionado durante toda la noche. La placa se lavó para eliminar la proteína no unida, y la proteína capturada se ensayó para actividad de AP usando el sistema Phospha-Light. La actividad de AP resultante se usó para cuantificar la capacidad de cada anticuerpo de  $\alpha$ -NRR para unirse a proteínas quiméricas específicas e inferir epítomos importantes para la unión.

60

7.     *Ensayo en perla de gel de fibrina HUVEC*

65    Se crecieron células HUVEC en perlas de gel de fibrina tal como se describe anteriormente (Nakatsu et al., 2003). Se recubrieron perlas Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech) con 350-400 células HUVEC por perla en 2 ml de medio EGM-2 (Clonetics). Se embebieron aproximadamente 200 perlas recubiertas en HUVEC en coágulo de fibrina en un pocillo de una placa de cultivo tisular de 12 pocillos.  $6 \times 10^4$  células de fibroblastos Detroit 551 se emplacaron sobre el

coágulo y controles de 5 µg/ml de anti-NRR, 1,5 µg/ml de anti-DLL4, 1 uM de DBZ, o vehículo. El medio se cambió cada dos días. Tras siete a nueve días, los geles de fibrina se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron las células endoteliales con anti-CD31 (R&D Systems AF806) usando un anticuerpo secundario conjugado a FITC para la detección.

5

#### 8. *Ensayo retinal neonatal in vivo*

Se inyectó a neonatos de CD1 i.p. a P1 y P3 con 10 mg/kg de control de ambrosía o 20 mg/kg de Notch-1. Se recogieron los ojos en P5 y se fijaron con PFA al 4 %. Se extrajeron las retinas por disección, se bloquearon (BSA al 5 %, Triton X-100 al 0,5 %) durante una hora seguido de tratamiento durante 10 min con citrato de sodio 1 M. Entonces se incubaron las retinas durante toda la noche a 4°C con isolectina B4 biotinilada (Sigma) y anticuerpo Ki67 (NeoMarkers). Las retinas se lavaron y se tiñeron posteriormente con estreptavidina-Alexa 488 y Cy3 de cabra anti-conejo en BSA al 1 %, Triton X-100 al 0,5 %. Las retinas se montaron en plano y se obtuvieron imágenes usando un microscopio de epifluorescencia.

15

#### 9. *Estudios de tumor in vivo*

Se creció la línea celular de tumor humano Calu-6 y HM7 en medio F12 de Ham, DMEM bajo en glucosa 1:1 suplementado con FBS al 10 % v/v, penicilina/estreptomina al 1 % v/v, L-Gln 2 mM y 1 µg/ml de Fungizone™ (Invitrogen™, CA). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de aire al 95 %/CO<sub>2</sub> al 5 %. Para los experimentos de xenoinjerto en ratón, se suspendieron las células tumorales a una concentración de  $1 \times 10^8$  o  $1 \times 10^9$  células/ml y se inyectaron (100 ml/ratón) por vía subcutánea en el lado dorsal de ratones Balb-c desnudos (Harlan Sprague Dawley, IN). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 400 mm<sup>3</sup>, se seleccionó una cohorte al azar (n = 10) como controles de día 0. Los demás ratones se dividieron en grupos de 10 ratones, y se administraron anticuerpos de fago anti-Notch1 i.p. a la dosis de 10 mg/kg dos veces a la semana. Los tumores trasplantados se midieron dos veces a la semana a lo largo del eje más largo y el eje perpendicular tal como se ha descrito. Para cada día en el que se midieron los tumores, se calculó el volumen tumoral para cada ratón, y las medias de volumen tumoral de cada grupo de anticuerpo de control (anti-ambrosía), anti-VEGF se compararon con la media de volumen tumoral de ratones tratados con anti-Notch1 mediante la prueba de Dunnett implementada en el sistema de análisis estadístico JMP™ (versión 5.1 para Windows; SAS Institute, Cary, NC), a un nivel de  $P < 0,05$ . Los ratones se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó los 2.000 mm<sup>3</sup>. Los tumores se seccionaron mediante Cryostat a 7 micras, se fijaron con acetona y se tiñeron con DAPI (Invitrogen), anticuerpo secundario de hámster anti-CD31 (Serotech, Inc.) y un secundario anti-Cy3 de hámster (Jackson Immunolabs). Los portaobjetos se montaron con Medio de Montaje Fluorescente (Dako). Se obtuvieron las imágenes con un microscopio Zeiss Axioskop2 y se analizaron con el programa ImageJ para área de tinción de DAPI y tinción de Cy3. La tinción de Cy3 se dividió entre el área de tinción de DAPI para normalizar al número de células presentes y se normalizaron los valores al tumor tratado con anti-ambrosía. Todos los estudios en animales se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos aprobados por el Comité de Cuidados y Uso de Animales.

#### 10. *Análisis de células B de zona marginal*

Se inyectó por vía IP dos veces por semana a ratones Balb-c (Jackson) de 12 semanas de edad durante dos semanas con 5 mg/kg de anti-gD, anti-NRR1 o anti-NRR2. Los esplenocitos se aislaron de los ratones y se tiñeron para FACS con B220-PerCP, CD23- PE y CD21-FITC (BD Biosciences) tal como se ha descrito anteriormente (Saito, et al., Immunity, Vol. 18, 675-685, mayo de 2003).

45

#### 11. *Histología e inmunohistoquímica de tejido intestinal de ratón*

Se administró a seis grupos de seis ratones C57BL/6 de 10 semanas de edad (Jackson) bien MCT cada dos días, DBZ a 30 µmol/kg cada dos días, Anti-NRR1 a 10, 2, o 0,4 mg/kg o Anti-gD de control (HSV-1) a 10 mg/kg en los días 0, 2 y 6, o como se indique de otro modo. Los tejidos del intestino delgado de los ratones fijados en formalina e incluidos en parafina se cortaron en secciones de 3 micras. La identificación histoquímica de los tipos celulares intestinales se llevó a cabo con Alcian Blue, tal como se recomienda por el fabricante (PolyScientific). Para la tinción anti-Ki67, las secciones se prepararon con solución de recogida de diana (S1700, DAKO), y se incubaron con anti-Ki67 de conejo (1:200, clon SP6, Neomarkers). El secundario de oveja anti-conejo a 7,5 µg/ml (Vector labs) se detectó con el kit Vectastain ABC Elite (Vector labs). Las secciones teñidas con Ki67 se contratiñeron con hemotoxilina de Mayer. Para la tinción anti-lisozima, las secciones se procesaron en la plataforma Discovery XT (Ventana Medical Systems, Inc.) usando condiciones de recuperación de epítipo CCIm, detección OmniMap-conejo y hemotoxilina II Ventana/con contratiñición azul. Para la tinción de HES-1, al anti-HES-1 de rata (clon NM1, MBL, International) le siguió TSA-HRP.

60

### B. Resultados

#### 1. *Generación de anticuerpos sintéticos que se dirigen específicamente a las regiones reguladoras negativas de Notch1 y Notch2*

65

Para permitir el antagonismo independiente de la señalización de Notch1 y Notch2 en seres humanos y ratones, se usó presentación en fagos para dirigirse al NRR y seleccionar anticuerpos sintéticos humanos con las siguientes cualidades. Primeramente, cada anticuerpo se seleccionó para inhibir potentemente su diana afin, Notch1 o Notch2, pero no otros receptores de Notch. En segundo lugar, se seleccionaron los anticuerpos para unión a secuencias diana humanas para permitir un direccionamiento terapéutico. En tercer lugar, para descubrir las consecuencias biológicas de inhibir sistémicamente Notch1 o Notch2 *in vivo* y para estudiar las funciones de estos receptores en modelos de ratón, se seleccionaron conjuntamente los anticuerpos para unión a secuencias ortólogas de ratón. En cuarto lugar, para evitar una respuesta inmunitaria humana anti-anticuerpo, las regiones determinantes de la complementariedad se clonaron en una región marco conservada humana de inmunoglobulina.

Siguiendo esta estrategia, se aislaron satisfactoriamente anticuerpos anti-NRR de Notch1 y anti-NRR de Notch2 con cada una de estas propiedades deseadas. Estos anticuerpos tienen varias ventajas frente a los inhibidores "pan-Notch" que se dirigen a múltiples receptores de Notch, tales como inhibidores de  $\gamma$ -secretasa. Debido a que estos anticuerpos distinguen entre receptores individuales de Notch, pueden analizar las distintas funciones de estos receptores individuales. Además, los inhibidores pan-Notch muestran efectos secundarios potencialmente no deseados *in vivo* debido a la inhibición dual tanto de Notch1 como de Notch2, y por lo tanto los anticuerpos que son selectivos para Notch1 o Notch2 pueden ser candidatos más atractivos para fines terapéuticos. Los anticuerpos anti-NRR de Notch1 y anti-NRR de Notch2 aislados de acuerdo con la estrategia anterior se describen y caracterizan en más detalle a continuación:

El aislamiento y caracterización de anticuerpos anti NRR1 de Notch se discuten en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US 2009/0081238 A1. Uno de los anticuerpos divulgados en esa solicitud, el "Anticuerpo A-2", se caracterizó respecto de su estructura y determinadas actividades biológicas. Determinados estudios discutidos en esa solicitud se recapitulan en el presente documento. Por conveniencia, el "Anticuerpo A-2" de la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US 2009/0081238 A1 se cita en el presente documento como "anti-NRR1".

El aislamiento y caracterización de anticuerpos anti-NRR de Notch2 se describe en el presente documento. Se aisló un anticuerpo anti-NRR de Notch2, denominado "Anticuerpo D". Este anticuerpo se maduró por afinidad tal como se describe anteriormente, dando como resultado el Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. La Figura 1 muestra las secuencias de HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 del Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. La Figura 2 muestra las HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. La Figura 3 muestra las secuencias de la región variable de cadena pesada del Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. La Figura 4 muestra las secuencias de la región variable de cadena ligera del Anticuerpo D, Anticuerpo D-1, Anticuerpo D-2, y anticuerpo D-3. Por conveniencia, El Anticuerpo D-3 se cita en el presente documento como "anti-NRR2."

Las medidas de las afinidades de unión usando resonancia de plasmón superficial (SPR) revelaron que anti-NRR1 se unía con afinidades similares y altas ( $K_d = 3$  nM) a proteínas NRR1 purificadas de secuencia de ratón o humana. Se observó una afinidad similar ( $K_d = 5$  nM) para los antígenos de NRR2 en las pruebas de anti-NRR2. La unión de ambos anticuerpos parecía ser elevadamente específica para el receptor afin; no se detectó unión a las secuencias humanas o de ratón de cualquiera de los otros tres receptores no diana para anti-NRR1 o anti-NRR2 usando una variedad de técnicas, incluyendo SPR, ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Figura 9 y datos no mostrados). Por ejemplo, Los resultados del ELISA demostraron que el anti-NRR1 se unió igualmente bien a proteínas NRR de Notch1 de ser humano y de ratón, observándose unión semimáxima a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1  $\mu$ g/ml. Anti-NRR1 no se unió detectablemente a las proteínas NRR de Notch2, NRR de Notch3 o NRR de Notch4-NRR de ser humano o de ratón, incluso a la mayor concentración de anticuerpo ensayada (Figura 9A, panel izquierdo), a pesar del hecho de que las secuencias de NRR de Notch1 humana y NRR de Notch2 humana son idénticas al 45 % (Figura 18). Se observaron resultados similares para anti-NRR2, que se unió específicamente a las proteínas NRR de Notch2 pero no a las proteínas NRR de otros receptores de Notch (Figura 9A, panel derecho).

Para determinar si anti-NRR1 y anti-NRR2 también se unen específicamente a receptores de longitud completa expresados en la superficie de células, se usó clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se determinó la unión a Notch1 o a Notch2, portando cada uno un marcador de epítipo myc en el extremo N-terminal para distinguir los receptores Notch transgénicos de receptores Notch expresados de manera endógena (particularmente Notch2, que se expresó por las células K1-CHO). La expresión en receptor se indujo en las células K1-CHO que se dejaron bien sin transfectar (Figura 9B, Paneles 1, 4, 7 y 10), transfectadas con myc-Notch1 (Figura 9B, Paneles 2, 5, 8 y 11) o transfectadas con myc-Notch2 (Figura 9B, Paneles 3, 6, 9 y 12). La unión de anti-NRR a células positivas a myc se observó en las células myc-N1 (Figura 9B, panel 2), pero no en las células K1-CHO progenitoras (Figura 9B, panel 1) y solo después de la inducción (Figura 9B, compárense los paneles 2 y 5), lo que indica que anti-NRR1 se unió específicamente a Notch1. Por el contrario, aunque se indujo claramente la expresión de myc-Notch2 en las células myc-N2 (Figura 9B, compárense los paneles 3 y 6), anti-NRR1 no se unió a myc-Notch2 (Figura 9B, compárense los paneles 2 y 3). Se llevó a cabo un análisis similar usando anti-NRR2 (Figura 9B, paneles 7-12), aunque este análisis resultó complicado por la expresión pobre de myc-Notch2 en ausencia de inducción (Figura 9B, paneles 6 y 12) y por la expresión endógena de Notch2 de hámster en la línea celular K1-CHO (Figura 9B, compárense los paneles 7 y 10



con los paneles 1 y 4). Sin embargo, anti-NRR2 solo se unió significativamente a las células que expresaban myc-Notch2 después de la inducción, lo que es coherente con la unión específica a Notch2 (Figura 9B, compárese el panel 9 con los paneles 8 y 12). En su conjunto, los resultados de unión usando proteínas NRR purificadas así como expresión en la superficie celular de receptores de longitud completa demuestran que anti-NRR1 se une específicamente a NRR1 de Notch1 y no a NRR de Notch2, e igualmente, el anti-NRR2 se une específicamente a NRR de Notch2 y no a NRR de Notch1. Esto se ve apoyado además por los numerosos estudios estructurales y funcionales descritos a continuación.

## 2. *Anti-NRR1 y anti-NRR2 funcionan como inhibidores específicos y potentes de la señalización de Notch1 y Notch2 in vitro*

Para evaluar si los anticuerpos anti-NRR afectaban a la señalización de Notch, primeramente se usó un ensayo de co-cultivo que empleó líneas celulares de NIH-3T3 diseñadas para expresar Jag1, como ligando de Notch, o bien Notch1 (Figura 10A) o Notch2 (Figura 10B) como receptor de Notch. Los ensayos reflejaron con precisión la señalización de Notch porque una señal fuerte indicadora de Notch (luciferasa de luciérnaga) dependía de la presencia de células que expresaban ligando y receptor (Figuras 10A y B, se comparan -Jag1 con +Jag1), y se redujo el nivel de indicador a valores de fondo cuando se incluyó un GSI (inhibidor de  $\gamma$ -secretasa) (Figuras 10A y B, se comparan DMSO con DAPT).

La adición de cantidades en aumento de anti-NRR1 inhibieron la señalización en las células de Notch1, observándose la inhibición completa a una concentración de anticuerpo entre 80 y 400 ng/ml (Figura 10A). Un anticuerpo humano de control no logró inhibir la señalización (Figura 10A, se compara  $\alpha$ -gD con el título de  $\alpha$ -NRR1), como si hicieron varios otros anticuerpos dirigidos contra antígenos distintos de Notch1 (datos no mostrados). Para ensayar adicionalmente si esta actividad inhibidora reflejaba unión de anti-NRR1, se planteó la cuestión de si la adición de antígeno NRR1 purificado rescataba la señalización en presencia de una concentración inhibidora (80 ng/ml) de anticuerpo anti-NRR1, compitiendo por la unión del anticuerpo a Notch1 expresado en las células de señalización. La adición de antígeno de NRR1 pero no de NRR2 (que apareció activo y plegado de manera adecuada en otros ensayos; véase la Figura 10B) restauró la señalización a niveles de control, (Figura 10A, se comparan 80 ng/ml de  $\alpha$ -NRR1 + NRR1 con 80 ng/ml de  $\alpha$ -NRR1 solo y 80 ng/ml de  $\alpha$ -NRR1 + NRR2). Como control, ninguno de los antígenos NRR1 o NRR2 afectaron a la señalización en co-cultivos que contenían un anticuerpo de control, lo que confirma que los fragmentos de NRR por sí mismos no tenían efecto directo en la señalización de Notch (Figura 10A,  $\alpha$ -gD + NRR1 y  $\alpha$ -gD + NRR2). Usando las células que expresan Notch2 para ensayar la actividad de anti-NRR2, se observaron resultados similares para la inhibición de anti-NRR2 de la señalización de Notch2 (Figura 10B). Ambos anticuerpos inhibieron la señalización inducida mediante todos los ligandos de Notch ensayados, es decir Jag1, Jag2, Dll1 y Dll4 (Figura 16 y datos no mostrados). En su conjunto, estos resultados demuestran que anti-NRR1 y anti-NRR2 son inhibidores específicos de parálogos potentes de la señalización de Notch1 y Notch2, respectivamente.

## 3. *Anti-NRR1 inhibe la señalización a través de ambas clases principales de receptores mutantes encontradas en las T-ALL*

Un mecanismo a través del cual se ha demostrado que la señalización de Notch afecta directamente a la oncogénesis es mediante la activación mutacional de la señalización de Notch1 en T-ALL. En particular, las mutaciones activantes de Notch1 en T-ALL se encuentran en dos categorías amplias: (1) aquellas que truncan el dominio PEST, estabilizando de este modo el ICD y aumentando la señalización de manera dependiente de ligando, y (2) aquellos que desestabilizan al NRR, permitiendo de este modo la escisión de ADAM y estimulando la señalización de manera dependiente de ligando. Para probar si anti-NRR1 puede suprimir la señalización a través de dichos receptores mutantes, se modificó el ensayo de co-cultivo para expresar Notch1-TS (Notch1 tipo silvestre), Notch1- $\Delta$ PEST (Notch1 que carece del dominio PEST), o Notch1-L1594P (Notch1 que porta la mutación L1594P en el dominio de heterodimerización (HD) del NRR). Al igual que se observó para la señalización de Notch1 de tipo silvestre (Figura 10C, panel superior), anti-NRR1 inhibió por completo la señalización dependiente e independiente de ligando mediante Notch1- $\Delta$ PEST y Notch1-L1594P (Figura 10C, paneles intermedio e inferior). Por lo tanto, anti-NRR1 antagoniza la señalización mediante ambas clases de receptores mutantes, incluyendo la mutación de L1594P que se encuentra en y desestabiliza al mismo dominio usado como diana por el anticuerpo.

## 4. *Anti-NRR1 y anti-NRR2 funcionan como inhibidores específicos y potentes de la señalización de Notch1 y Notch2 in vivo*

Para determinar si anti-NRR1 y anti-NRR2 funcionan como inhibidores específicos de receptor *in vivo*, se investigó cómo afectaron los anticuerpos a decisiones de destino celular para las que las técnicas genéticas habían establecido un papel para Notch1 o Notch2. Específicamente, la inactivación condicional de Notch1 o Notch2 había revelado previamente que Notch1 es clave para determinar un destino celular T frente a B durante el desarrollo linfóide, mientras que Notch2 es necesario para generar células B de zona marginal esplénica (MZB). De manera coherente con una función crucial de Notch1 en el desarrollo de células T, se descubrió que al tratar a los ratones con anti-NRR1, pero no con anti-NRR2, se redujeron significativamente los pesos del timo (Figuras 11A y B). Del mismo modo, anti-NRR1, pero no con anti-NRR2, redujo dramáticamente el número total de células en el timo (Figura 11B) e inhibió prácticamente por completo la generación de células T dobles positivas a CD4+/CD8+ (Figura 11C).

Por el contrario, se revirtieron los efectos del anticuerpo cuando se examinaron las células MZB. El tratamiento con anti-NRR2 prácticamente eliminó a las células MZB ( $0,97 \pm 0,45$  en comparación con el valor de control de  $6,61 \pm 0,25$ ), reduciendo la población de manera incluso más dramática que la proteína de fusión purificada de receptor de linfotóxina  $\beta$  recombinante (LT $\beta$ R)-Fc ( $3,48 \pm 0,06$ ), que sirvió como control positivo (Figura 11D). Este efecto inhibitorio fue específico para anti-NRR2 porque anti-NRR1 no redujo significativamente la población de MZB ( $6,00 \pm 0,44$ ) en relación al anticuerpo de control anti-gD ( $6,61 \pm 0,25$ ; Figura 11D). En su conjunto, estos estudios *in vivo* indican que ambos anticuerpos son potentes inhibidores de sus respectivas dianas que pueden inducir cambios biológicamente significativos en las decisiones de destino celular; además, debido a que anti-NRR1 afecta a la generación de células T pero no de células MZB mientras que anti-NRR2 afecta a la generación de células MZB pero no de células T, cada anticuerpo funciona específicamente para su diana prevista *in vivo*.

5. *Una estructura co-cristalina revela que anti-NRR1 puentea los dominios LNR y HD-C y probablemente estabiliza la conformación "inactivada" de NRR*

Para dilucidar la especificidad de unión de anti-NRR1 y anti-NRR2 y obtener una visión mecanística de la actividad antagonista del anticuerpo, se ensayó la unión de ambos anticuerpos a una batería de proteínas NRR quiméricas. Específicamente, se produjeron NRR quiméricos intercambiando cada uno de los subdominios de NRR (LNR-A, LNR-B, LNR-C, HD-N y HD-C) entre Notch1 y Notch2, se expresaron estas quimeras como proteínas secretadas fusionadas a fosfatasa alcalina para una fácil detección, y se ensayó la unión de cantidades normalizadas de cada NRR quimérico a anti-NRR1 o anti-NRR2. De los 26 NRR quiméricos que se expresaron, 17 se detectaron de manera eficaz como proteínas secretadas (Figura 12A), 7 se detectaron débilmente y 2 no se detectaron por encima del fondo (Figura 17), lo que sugiere que se expresaron la mayoría pero no todos los NRR quiméricos, plegados y secretados de manera adecuada. El intercambio solo el dominio LNR-A de NRR2 en la estructura de NRR1 alteró la unión de anti-NRR1 (Figura 12A, quimera BC.Hd y todos los demás con LNR-A de NRR2), lo que indica que los contactos de anti-NRR1 con el subdominio LNR-A de NRR1 son esenciales para la unión. Por el contrario, el intercambio de los dominios LNR-C y/o HD-N de NRR2 en NRR1 no afectó a la unión de anti-NRR1 (Figura 12A, quimeras AB.Hd, ABC.Hc y AB.Hc), lo que demuestra que ninguno de estos dominios es esencial para la especificidad de unión. Por último, AB.Hc con el menor número de subdominios de NRR1 que aún soportaba unión completa de anti-NRR1 (aunque se observó una unión débil a la quimera AB), lo que sugiere que la mayoría, y quizá todos, los contactos necesarios para la especificidad de unión de anti-NRR1 están contenidos en los dominios LNR-A, LNR-B y HD-C.

La caracterización de anti-NRR2 reveló un patrón de unión similar al definido para anti-NRR1, aunque con algunas diferencias distintivas. El intercambio del dominio LNR-A de NRR1 en la estructura de NRR2 alteró completamente la unión de anti-NRR2, mientras que los intercambios de LNR-B o LNR-C no tuvieron efecto; por lo tanto, como en el caso de anti-NRR1, la unión de anti-NRR2 necesita el subdominio LNR-A de Notch2. Del mismo modo, el dominio HD-C de Notch2 también fue esencial. Dos quimeras diferentes (C.Hn y BC) con solo tres subdominios de NRR2 soportaron unión completa en este ensayo; ambas quimeras comparten los subdominios LNR-A y HD-C de NRR2 y, de manera coherente con esta observación, la quimera que solo contenía los subdominios LNR-A y HD-C de NRR2 soportó una unión débil aunque detectable a anti-NRR2. Por lo tanto, al definir los subdominios que determinan la especificidad de unión de anti-NRR2, los experimentos de intercambio de dominio: (a) revelan que LNR-A y HD-C son los más importantes (necesarios y parcialmente suficientes para la especificidad de unión) y (b) sugieren que los contactos del anticuerpo anti-NRR2 en LNR-B y HD-N también pueden tener un papel.

Para entender mejor la base molecular de la actividad antagonista de anti-NRR1, se determinó la estructura cristalina de 2,2 Å del fragmento Fab del anticuerpo unido a NRR1 humano. Esta estructura reveló que NRR1 forma una estructura compacta muy similar a la de NRR2 humano, con tres módulos de  $\text{Ca}^{2+}$  de unión a LNR envueltos alrededor del dominio central HD (Figuras 12B y C). La estructura revela que el efecto aparente de la unión de Fab es estabilizar las interacciones LNR-HD de tal forma que S2 no está accesible para escisión, manteniendo quiescente de este modo la cascada de señalización de Notch1. Esta interpretación está apoyada por la observación de que Fab no ocluye directamente el sitio S2, sino que se une en la interfaz entre los dominios HD, LNR-A y LNR-B (Figura 12D), lo que es coherente con los experimentos de intercambio de dominio (Figura 12A). Esta interfaz entierra  $\sim 2000 \text{ \AA}^2$  de superficie accesible a disolvente, dividida a partes iguales entre el Fab y NRR1. La cadena pesada de Fab entra en contacto con LNR-B, la hélice final en el dominio HD-C, y la periferia de LNR-A. CDR H3 se ubica en la interfaz entre LNR-B y HD. En particular, R99 de H3 forma un enlace de hidrógeno con el carbonilo de la estructura de Phe1501 de LNR-A mientras que la porción alifática de la cadena lateral interactúa con L1710 del dominio HD. La cadena ligera supone  $\sim 40 \%$  del área superficial enterrada contribuida por el Fab y entra en contacto con el bucle conector antes de la hélice final en los dominios HD así como LNR-A.

Esta estructura también revela la base de la especificidad de Fab por Notch1 frente a Notch2. A pesar de  $\sim 45 \%$  de identidad de secuencia entre los dominios NRR de Notch1 y Notch2, la mayoría de los restos implicados en la interfaz son distintos entre las dos proteínas. Por ejemplo, de los 21 restos de NRR que al menos un 25 % de superficie accesible a disolvente en la unión con Fab, solo seis son idénticos en Notch1 y Notch2. Estos seis restos contribuyen a menos de un cuarto del área superficial en el epítipo de Fab y se distribuyen a lo largo del epítipo (Figuras 12D y 18).

6. *La inhibición selectiva de la señalización de Notch1 desregula la angiogénesis*

Para comenzar a explotar los anticuerpos específicos de receptor Notch para definir la importancia funcional de receptores individuales *in vivo*, se planteó en primer lugar la pregunta de si el bloqueo selectivo de la señalización de Notch1 con anti-NRR1 podría interrumpir la angiogénesis en mamíferos. Numerosos informes indican que la ruta de Notch funciona aguas abajo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y que juega un papel clave en la angiogénesis regulando la selección de destino celular endotelial entre células de punta y tallo. Los experimentos que usan una diversidad de herramientas genéticas y bioquímicas, incluyendo anticuerpos bloqueantes específicos de Dll4, han establecido que Dll4 es el ligando de Notch clave implicado en la señalización angiogénica, aunque dos receptores de Notch, Notch1 y Notch4, se han implicado como receptores para Dll4 en la angiogénesis.

Primeramente se ensayó si la inhibición selectiva de Notch1 afectó la brotación endotelial *in vitro*. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) co-cultivadas con fibroblastos de piel humana generan brotes con estructuras de tipo luminal. De manera coherente con trabajos anteriores, se descubrió que la inhibición pan-Notch usando DBZ, un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa, así como el bloqueo selectivo de anticuerpo de Dll4 aumentó tanto el número como la longitud de brotes de células endoteliales. De manera importante, el bloqueo selectivo de la señalización de Notch1 usando anti-NRR1 generó un fenotipo similar (Figuras 13A y 13B).

Para determinar si anti-NRR1 afecta a la angiogénesis *in vivo*, se usó un modelo basado en el desarrollo de vasculatura retinal en ratones neonatos. La administración sistémica de anti-NRR1 alteró dramáticamente el desarrollo de la vasculatura retinal en ratones neonatos tratados (Figura 13C). En relación al tratamiento con un anticuerpo anti-ambrosía de control, el tratamiento con anti-NRR1 generó una red vascular densa, compacta y aparentemente enmarañada (Figura 13C, compárense los paneles I y III con los paneles II y IV, respectivamente). Esta acumulación aumentada de células endoteliales se correlacionó con una proliferación aumentada, según se determinó marcando con el marcador de proliferación Ki67 (Figura 13C, compárense los paneles V y VI). Estas observaciones, incluyendo la densidad vascular aumentada, la acumulación de células endoteliales y la proliferación aumentada, imitan estrechamente las encontradas después de la inhibición de f114 o  $\gamma$ -secretasa usando este mismo modelo de neonato (datos no mostrados) y son coherentes con los resultados de otros estudios, incluyendo el análisis de la vasculatura tumoral (Figuras 13D y 13E) y el ensayo de bolsillo corneal de ratón (datos no mostrados). Estos resultados demuestran no solo que anti-NRR1 posee una potente actividad biológica, sino también que la inhibición solo de Notch1, a diferencia de Notch4 o una combinación de Notch1 y Notch4, es suficiente para alterar dramáticamente la angiogénesis en mamíferos.

7. *El bloqueo selectivo de anticuerpos de Notch1 inhibe el crecimiento tumoral en modelos preclínicos*

Para determinar si bloquear Notch1 selectivamente usando anti-NRR1 sería suficiente para inhibir el crecimiento tumoral, se usaron modelos de tumor preclínicos y se comparó el crecimiento de tumores establecidos después de tratamiento con anticuerpos anti-NRR1, anti-VEGF o anti-ambrosía. En ambos modelos, Calu6 y HM7, los grupos tratados con anti-NRR1 mostraron una disminución significativa en el tamaño del tumor en relación a los grupos de control, incluso en los primeros puntos temporales examinados, de tres a cuatro días después de la dosis inicial (Figuras 13A-C). En el modelo de Calu6, el grupo de anti-NRR1 mostró una disminución en el tamaño del tumor, de aproximadamente 250 mm<sup>3</sup> a menos de 100 mm<sup>3</sup>, similar a la disminución observada en el grupo de anti-VEGF; por el contrario, los tumores en el grupo de control anti-ambrosía crecieron hasta un tamaño mayor de 400 mm<sup>3</sup> (Figura 14A). Se observaron resultados similares usando el modelo HM7 de crecimiento agresivo; el tratamiento con anti-NRR1 hizo que el tamaño del tumor permaneciese estático (Figura 14B) o prácticamente estático (Figura 14C) durante 12-13 días, una diferencia dramática en relación al crecimiento en seis días de 250 mm<sup>3</sup> a más de 900 mm<sup>3</sup> que se observó en el grupo de control (Figuras 14B y 5C). Se observó una inhibición similar del crecimiento tumoral usando una intervalo de concentraciones de dosis de anti-NRR1, entre 20 mg/kg y 2,5 mg/kg, aunque los grupos de 10 y 20 mg/kg mostraron una tendencia hacia una inhibición más fuerte en relación a los grupos de 2,5 y 5 mg/kg (Figura 14C).

Se investigaron los modelos de tumor de Calu6 o HM7 debido a que su respuesta a agentes anti-angiogénicos está bien documentada. Para ensayar directamente si anti-NRR1 alteró la angiogénesis en el modelo de Calu6, se examinó la vasculatura en secciones representativas de tumor de ratones en los tres grupos de tratamiento. Al normalizar la tinción de CD31, un marcador de células endoteliales, a la tinción de ADN, usando DAPI, se descubrió que anti-NRR1 aumentó significativamente la tinción de CD31 en relación a los demás grupos (Figura 14D). Este aumento fue estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ), y se observó de manera consistente en múltiples imágenes (Figura 14E). Por el contrario y como se esperaba, anti-VEGF produjo una reducción en la tinción de CD31 (Figuras 14D y 14E). Los resultados del bloqueo selectivo de Notch1 imitan por lo tanto aquellos comunicados para el bloqueo selectivo de Dll4, lo que da lugar de manera similar a un aumento en la tinción de CD31 de tumor así como a la generación de una vasculatura tumoral de funcionamiento deficiente. En su conjunto, estos resultados sugieren que los efectos antitumorales ejercidos por anti-NRR1 en los modelos Calu6 y HM7 reflejaron principalmente una alteración en la angiogénesis tumoral.

8. *La inhibición con anticuerpos tanto de Notch1 como de Notch2 tiene efectos destacados en el destino celular intestinal*

Los inhibidores de gamma-secretasa (GSI), que son inhibidores pan-Notch que inhiben a múltiples receptores de Notch, provocan pérdida de peso y metaplasia de células calciformes intestinales, lo que refleja el papel que juega Notch en la determinación del destino celular manteniendo la proliferación de las células progenitoras de la cripta intestinal y prohibiendo la diferenciación a un destino celular secretor. (Véase van Es et al., Nature 435:959-963 (2005)). Además, los estudios genéticos usando ratones *knockout* condicionales para Notch sugirieron que la alteración tanto de Notch1 como de Notch2 es necesaria para provocar metaplasia de células calciformes intestinales. (Véase Riccio et al., EMBO Rep. 9:377-383 (2008)). Se usó anti-NRR1 y anti-NRR2 para determinar los efectos de la inhibición selectiva de Notch1 o Notch2, o ambos, en la pérdida de peso y la diferenciación de células intestinales.

Los ratones tratados con anti-NRR1 mostraron una disminución leve en el peso corporal general durante la duración de la dosificación de anticuerpo. En un primer experimento que comparaba directamente anti-NRR1 y anti-NRR2, se descubrió que anti-NRR1 causó una disminución del 5 % en el peso corporal total, a diferencia de las ganancias de peso observadas en los grupos de anti-NRR2 así como en los grupos de anti-gD y anti-LTβR-Fc de control (Figura 15A). En un segundo experimento, la inhibición selectiva de Notch1 o Notch2 usando anti-NRR1 o anti-NRR2, respectivamente, dio como resultado poco o ningún efecto sobre el peso. Los resultados de ese experimento se ilustran en la Figura 24A, en el que se dosificó a los ratones con 5 mg/kg de anti-NRR1 (cuadrados), anti-NRR2 (triángulos), o anticuerpo de control ("α-gD", rombos) en los días indicados mediante flechas. Sin embargo, los ratones tratados tanto con anti-NRR1 como con anti-NRR2 ("X" en la Figura 24A) perdieron aproximadamente un 20 % de su peso corporal inicial en tan poco tiempo como en el día 7.

Se investigó si esta pérdida sutil de peso resultante solo del tratamiento con anti-NRR1, o si la pérdida de peso más dramática resultante del tratamiento tanto con anti-NRR1 como con anti-NRR2, reflejaban cambios en la determinación del destino celular. Después de dosificar a los ratones con anti-NRR1 o anti-gD o DBZ como controles, se analizaron secciones del intestino grueso (Figura 19) y de intestino delgado en el día 2 (Figura 20) y en el día 7 (Figura 15B) usando una diversidad de tinciones histoquímicas. DBZ tuvo los mismos efectos descritos anteriormente para GSI (Figura 15B, columna de DBZ): inhibición de la expresión de Hes1 correlacionada con una disminución en la proliferación de células progenitoras (mostrado mediante tinción de Ki-67) y una expansión dramática de la población de células calciformes (mostrado mediante la tinción de mucina con Alcian Blue). La tinción de lisozima también sugirió que DBZ aumentó el número y/o actividad de las células de Paneth, una segunda población de células secretoras (Figura 15B), una sugerencia que se apoyó adicionalmente usando tinción de Azure A-Eosina B para gránulos de células de Paneth (datos no mostrados). Anti-NRR1 a 10 mg/kg indujo cambios intestinales indistinguibles de aquellos inducidos por DBZ (Figura 15A, compárese DBZ a 30 mmol/kg con α-NRR1 a 10 mg/kg). Estos cambios intestinales dependen de la concentración de anti-NRR1, de tal forma que se observaron cambios de destino celular significativos usando 10 mg/kg y 2,0 mg/kg pero pocos, o ningún cambio notable se observó usando 0,4 mg/kg. El intestino grueso respondió de manera similar a tratamiento con DBZ y anti-NRR1: ambos tratamientos redujeron significativamente la señalización de Notch (Figura 19, tinción de Hes1), bloquearon la proliferación de células progenitoras (Figura 19, Ki-67) y aumentaron el número de células calciformes (Figura 19, Alcian Blue y H&E). Los cambios de destino celular solo fueron débilmente detectables en un punto temporal temprano, día 2 de este estudio (Figura 20; nótese los cambios leves pero detectables, causados tanto por DBZ como por anti-NRR1, observados en la tinción de Ki-67 y de Alcian Blue).

Para determinar si la inhibición de la señalización de Notch2 puede afectar de manera similar a la determinación del destino de células intestinales, se compararon directamente los efectos de anti-NRR1 y de anti-NRR2 en el intestino grueso (datos no mostrados) y delgado (Figura 15C, que muestra la tinción de Alcian Blue y de Ki-67, y la Figura 24B, que muestra la tinción de Alcian Blue). Mientras que anti-NRR1 ocasionó metaplasia de células calciformes que coincidía con una disminución en la expresión de Ki-67 en los progenitores de la cripta, anti-NRR2 no causó ningún efecto detectable (Figuras 15C y 24B, compárese anti-NRR2 con control anti-gD). Debido a que anti-NRR1 y anti-NRR2 funcionan como inhibidores específicos y potentes de la señalización de Notch1 y Notch2, respectivamente, tanto *in vivo* (Figura 11) como *in vitro* (Figuras 9, 10 y 21), estos resultados sugieren de manera concluyente que la inhibición selectiva de Notch1, pero no de Notch2, es suficiente para alterar la determinación del destino de células intestinales.

También se investigó el efecto de inhibir tanto Notch1 como Notch2 en la determinación del destino de células. La Figura 22 muestra efectos sinérgicos de anti-NRR1 y anti-NRR2 en la diferenciación alterada de células intestinales. Se dosificó a ratones Balb/c hembra con 5 mg/kg de anti-NRR, 1,5 mg/kg de anti-NRR2 o 5 mg/kg de anti-NRR1 más 5 mg/kg de anti-NRR2 en los días 0, 4, 7 y 11. Se recogieron los intestinos y se tiñeron con H&E para revelar la morfología de la cripta. Para los ratones tratados solo con anti-NRR1 o anti-NRR2, los intestinos se recogieron en el día 12; para los ratones tratados con ambos anticuerpos a la vez, se recogieron los intestinos en el día 6 porque los ratones en este grupo estaban perdiendo peso rápidamente. El análisis de los intestinos indicó que la combinación de anticuerpos dio como resultado un fenotipo más grave que el observado después del tratamiento solo con anti-NRR1, lo que sugiere que Notch1 y Notch2 funcionan juntos y de manera parcialmente redundante en el intestino de mamífero. Los experimentos adicionales confirmaron esta observación. Tal como se muestra en la Figura 24B. Los intestinos de ratones tratados con anti-NRR1 y anti-NRR2 mostraron metaplasia de células calciformes grave. Aunque el tratamiento solo con anti-NRR1 fue suficiente para inducir cierto grado de metaplasia de células calciformes, el efecto de solo anti-NRR1 fue leve en comparación con el efecto de tanto anti-NRR1 como anti-NRR2 en combinación.

En su conjunto, los resultados indican que Notch1 y Notch2 funcionan de manera redundante en la diferenciación de células intestinales, aunque una potente inhibición de Notch1 pero no de Notch2 es suficiente para revelar un fenotipo parcial. Se barajó la hipótesis de que la capacidad para detectar este fenotipo particular, no comunicado previamente en estudios genéticos, refleja que anti-NRR1 proporciona una inhibición más potente y uniforme de la señalización de Notch1 en las células de la cripta que la que puede lograrse después de un *knockout* génico condicional, que puede ser incompleta. De manera importante, al reducir o evitar significativamente la metaplasia de células calciformes, que es un indicador de inhibición general de Notch, los anticuerpos inhibidores específicos de Notch1 y Notch2 comunicados en el presente documento representan un claro progreso en los inhibidores pan-Notch, tales como los GSI.

9. *Rescate de fenotipo intestinal anti-NRR1*

La Figura 23 muestra que la dexametasona rescata al menos parcialmente el fenotipo intestinal causado por anti-NRR1. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (IP) a ratones NCR hembra desnudos (res ratones por grupo) del modo siguiente:

- Grupo A) Combinación de vehículo, MCT, una vez al día, anticuerpo de control anti-gD a 4 mg/kg, cada cuatro días (no mostrado en la figura);
- Grupo B) Dexametasona, 90 mg/kg, a diario (no mostrado en la figura);
- Grupo C) Anti-NRR a 1,4 mg/kg, cada cuatro días;
- Grupo D) Dexametasona, 90 mg/kg, una vez al día, y Anti-NRR1, 4 mg/kg, cada cuatro días.

El vehículo era hidroxipropilmetilcelulosa al 0,5 % (p/v) (Methocel E4M) y Tween 80 al 0,1 % (p/v) en agua (MCT), que se había demostrado anteriormente que no causa efectos clínicos adversos.

Los intestinos se recogieron en el día 9 y se tiñeron con anti-Ki67 (marcador de proliferación) y con Alcian Blue (para mucina). Este experimento reveló que los ratones tratados con la combinación de dexametasona más anti-NRR1 mostraron un fenotipo intestinal más leve en relación a los ratones tratados solo con anti-NRR1, sugiriendo por lo tanto que la dexametasona protege al intestino de los cambios inducidos por anti-NRR1 en la diferenciación.

10. *Anti-NRR2 suprime el crecimiento de líneas celulares de melanoma*

Se investigó el efecto de anti-NRR1 y anti-NRR2 en el crecimiento de líneas celulares de melanoma. Se emplazaron las líneas celulares de melanoma humano SK23 y LOX-IMVI en medio que contenía FBS al 2 % a baja densidad (4000 células/pocillo para SK23, 2500 células/pocillo para LOX-IMVI) en placas de 96 pocillos que se recubrieron sin (-jag-1) o con ligando de Jagged-1 (+jag-1) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se añadió anti-NRR1 (20 mg/ml), anti-NRR2 (20 mg/ml), o inhibidor de gamma-secretasa (GSI) DAPT (5 µM) a los cultivos y se volvió a añadir en días alternos posteriormente. Un volumen igual de DMSO sirvió como control de vehículo, mientras que una concentración de anticuerpo de fago HuB6 anti-gD sirvió como anticuerpo de control de isotipo. Se llevaron a cabo ensayos Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) seis días después de la siembra. Los resultados se muestran en las Figuras 25A y 25B (anti-NRR1 y anti-NRR2 se citan como "anti-N1" y "anti-N2"). En las Figuras 25A y 25B, la viabilidad celular (eje y) se expresa en relación a los valores de los pocillos de control de vehículo de DMSO, -jag-1. Ambas líneas celulares de melanoma mostraron una disminución en la viabilidad en respuesta al tratamiento con GSI (especialmente en presencia de ligando Jag1) y al tratamiento anti-NRR2, pero no al tratamiento anti-NRR1.

11. *Anti-NRR2 suprime el crecimiento del linfoma difuso de células B grandes in vitro*

El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) es el tipo más común de linfoma no Hodgkin. Un estudio reciente de células cancerosas de pacientes con DLBCL indicó que aproximadamente el 8 % de los pacientes portan una mutación de dominio PEST en Notch2, una mutación que se predice que prolonga la señalización de Notch2 después de la activación de ligando. (Véase Lee et al., Cancer Sci. 100:920-926, 2009). Sin embargo, no se sabía cómo responderían las células de DLBCL a la inhibición de Notch2. Por lo tanto, se investigó el efecto de anti-NRR2 en cinco líneas celulares de DLBCL. Las líneas celulares de DLBCL listadas a la derecha de la Figura 26 se crecieron en replicados durante tres días en los pocillos de una placa de 384 pocillos. Los cultivos celulares incluyeron las concentraciones indicadas de anti-NRR2 (citado como "anti-Notch2" en las Figuras 26 y 27), que correspondieron a diluciones en serie de tres veces comenzando a 10 µg/ml. El crecimiento se evaluó usando ensayos Cell Titer Glo (Promega), representado como el porcentaje de viabilidad celular en relación al tratamiento con un anticuerpo de control de isotipo. Los puntos de datos en la Figura 26 representan valores medios obtenidos de pocillos individuales para cada línea celular a las concentraciones indicadas de anticuerpo. Tal como se muestra en la Figura 26, el crecimiento de una de las líneas celulares, "DB" se inhibió fuertemente mediante tratamiento con anti-NRR2. La Figura 27 muestra el crecimiento de la línea celular DB a lo largo del tiempo. La línea DB se creció en los pocillos de una placa de 12 pocillos, y los cultivos se trataron con DMSO, el inhibidor de gamma-secretasa DAPT, y con anticuerpo de control de isotipo anti-gD o con anti-NRR2 a las concentraciones indicadas. El crecimiento se evaluó contando células viables (Vi-CELL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) en los días 2, 3 y 5 después de inocular y tratar a los cultivos. Los valores representan la media de las medidas de tres cultivos independientes, más/menos la desviación estándar. La Figura 27 muestra que anti-NRR2 suprime el crecimiento de la línea celular de DLBCL, DB, *in vitro*.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención-

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC., *et al.*,

<120> ANTICUERPOS ANTI-NOTCH2 Y MÉTODOS DE USO

10

<130> P4244R1 WO

<140>

15

<141> 30-09-2009

<150> 61/101.917

<151> 01-10-2008

<160> 75

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-H1 de Anticuerpo D

30

<400> 1

**Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Gly Met Ser**  
**1 5 10**

35

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-H1 de Anticuerpos D-1, D-2, y D-3

<400> 2

**Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser**  
**1 5 10**

45

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia sintética consenso de HVR-H1

55

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ser o Thr

60

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)  
<223> Ser o Thr

<400> 3

5

**Gly Tyr Xaa Phe Xaa Ser Tyr Gly Met Ser**  
**1 5 10**

<210> 4  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-H2 de Anticuerpos D, D-1, D-2, y D-3

15

<400> 4

**Ser Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val**  
**1 5 10 15**

**Lys Gly**

<210> 5  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-H3 de Anticuerpos D, D-1, D-2, y D-3

25

<400> 5

**His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val**  
**1 5 10**

30

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L1 de Anticuerpo D

40

<400> 6

**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L1 de Anticuerpo D-1

50

<400> 7

ES 2 541 726 T3

**Arg Ala Ser Gln Ser Asn Arg Arg Phe Leu Ala**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10**

5 <210> 8  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L1 de Anticuerpo D-2  
 <400> 8

**Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe Leu Ala**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10**

15 <210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L1 de Anticuerpo D-3  
 <400> 9

**Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe Leu Ala**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10**

25 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia sintética consenso de HVR-L1

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Ser o Asn

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Ile, Asn o Val

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Ser, Arg o Lys

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Ser o Arg

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Tyr o Phe



ES 2 541 726 T3

<400> 10

**Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala**  
**1 5 10**

5 <210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L2 de Anticuerpos D y D-1

<400> 11

**Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser**  
**1 5**

15 <210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L2 de Anticuerpo D-2

25 <400> 12

**Arg Ala Ser Ile Arg Ala Ser**  
**1 5**

30 <210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L2 de Anticuerpo D-3

<400> 13

**Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser**  
**1 5**

40 <210> 14  
<211> 7  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia sintética consenso de HVR-L2

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Gly o Arg

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Ser, Ile o Thr

ES 2 541 726 T3

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Ala o Glu  
5  
<400> 14

**Xaa Ala Ser Xaa Arg Xaa Ser**  
**1 5**

10 <210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L3 de Anticuerpo D  
<400> 15

**Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr**  
**1 5**

20 <210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L3 de Anticuerpo D-1  
<400> 16

**Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Leu Thr**  
**1 5**

35 <210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L3 de Anticuerpo D-2  
<400> 17

**Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Trp Thr**  
**1 5**

45 <210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético HVR-L3 de Anticuerpo D-3  
<400> 18

55

**Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His Thr**  
**1 5**

5 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia sintética consenso de HVR-L3

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Ser, Ile o Arg

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Leu, Trp o His

<400> 19

**Gln Gln Tyr Tyr Xaa Ser Pro Xaa Thr**  
**1 5**

25 <210> 20  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de cadena pesada de región variable de anticuerpo D

35 <400> 20

ES 2 541 726 T3

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly**  
**1 5 10 15**

**Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr**  
**20 25 30**

**Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val**  
**35 40 45**

**Ser Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val**  
**50 55 60**

**Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr**  
**65 70 75 80**

**Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**85 90 95**

**Ala Arg His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val Trp**  
**100 105 110**

**Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala**  
**115 120**

- <210> 21
- <211> 122
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de cadena pesada de región variable de anticuerpos D-1, D-2, y polipéptido D-3
- <400> 21

ES 2 541 726 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 22

<211> 108

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de cadena ligera de región variable de anticuerpo D

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de cadena ligera de región variable de anticuerpo D-1

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Asn Arg Arg Phe  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 24

<211> 108

<212>

<213> Secuencia Artificial

ES 2 541 726 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de cadena ligera de región variable de anticuerpo D-2

5 <400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Ile Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de cadena ligera de región variable de anticuerpo D-3

15

<400> 25

ES 2 541 726 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 26  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 26



ES 2 541 726 T3

Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly  
 20 25 30  
 Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys  
 50 55 60  
 Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser  
 85 90 95  
 Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp  
 100 105 110  
 Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr  
 115 120 125  
 Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser  
 130 135 140  
 Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val  
 145 150 155 160  
 Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly  
 165 170 175  
 Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly  
 180 185 190  
 Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu  
 195 200 205  
 Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met  
 210 215 220

ES 2 541 726 T3

Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys  
225 230 235 240

Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala  
245 250 255

Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys  
260 265 270

Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln  
275 280 285

- 5  
<210> 27  
<211> 278  
<212> PRT  
<213> *Mus* sp.  
  
<400> 27

ES 2 541 726 T3

Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Val Cys Asn Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly  
 20 25 30  
 Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys  
 50 55 60  
 Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu  
 65 70 75 80  
 Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser  
 85 90 95  
 Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp  
 100 105 110  
 Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr  
 115 120 125  
 Leu Val Leu Val Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser  
 130 135 140  
 Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val  
 145 150 155 160  
 Phe Lys Arg Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly  
 165 170 175

ES 2 541 726 T3

His Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly  
180 185 190

Trp Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg  
195 200 205

Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu  
210 215 220

Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser  
225 230 235 240

Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser  
245 250 255

Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu  
260 265 270

Pro Pro Leu Pro Ser Gln  
275

- <210> 28
- <211> 256
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <400> 28

5

ES 2 541 726 T3

Pro Ala Thr Cys Leu Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly  
 1 5 10 15

Val Cys Asp Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly  
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Thr Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro  
 35 40 45

Leu Pro Cys Trp Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn  
 50 55 60

Thr Val Glu Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Gly Asn Ser Lys  
 65 70 75 80

Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His  
 85 90 95

Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp  
 100 105 110

Cys Ala Ala Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Val Ile

ES 2 541 726 T3

	115		120		125														
Val	Val	Leu	Met	Pro	Pro	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ala	Arg	Ser	Phe				
	130					135					140								
Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	His	Thr	Asn	Leu	Arg	Ile	Lys	Arg				
145					150					155					160				
Asp	Ser	Gln	Gly	Glu	Leu	Met	Val	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Lys	Ser				
				165					170						175				
Ala	Ala	Met	Lys	Lys	Gln	Arg	Met	Thr	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Glu				
			180					185					190						
Gln	Glu	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Ile	Asp	Asn				
		195					200					205							
Arg	Gln	Cys	Val	Gln	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala				
	210					215					220								
Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	His	Ala	Ile	Gln	Gly	Thr	Leu	Ser	Tyr				
225					230					235					240				
Pro	Leu	Val	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Arg	Thr	Gln				
				245					250						255				

<210> 29  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> *Mus* sp.  
 <400> 29

5

ES 2 541 726 T3

Pro Ala Thr Cys Gln Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Cys Asp Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly  
 20 25 30

Asp Cys Ser Leu Thr Met Glu Asp Pro Trp Ala Asn Cys Thr Ser Thr  
 35 40 45

Leu Arg Cys Trp Glu Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Gln Cys Asn  
 50 55 60

Thr Ala Glu Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Arg Asn Ser Lys  
 65 70 75 80

Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His  
 85 90 95

Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp  
 100 105 110

Cys Ala Ser Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Ile Ile  
 115 120 125

Val Val Leu Leu Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ser Arg Ser Phe  
 130 135 140

Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg Ile Lys Gln  
 145 150 155 160

Asp Ser Gln Gly Ala Leu Met Val Tyr Pro Tyr Phe Gly Glu Lys Ser  
 165 170 175

Ala Ala Met Lys Lys Gln Lys Met Thr Arg Arg Ser Leu Pro Glu Glu  
 180 185 190

Gln Glu Gln Glu Gln Glu Val Ile Gly Ser Lys Ile Phe Leu Glu Ile  
 195 200 205

Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp Gln Cys Phe Lys Asn Thr  
 210 215 220

Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Phe Ser Glu Leu Glu Ser Pro Arg Asn  
 245 250 255

Ala Gln

<210> 30  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

5

10

15



ES 2 541 726 T3

<210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de región marco conservada 4  
 10  
 <400> 31  
**Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**1 5 10**  
 <210> 32  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético  
 20  
 <400> 32  
**Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**  
**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr**  
**20 25 30**  
 <210> 33  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 30  
 <400> 33  
**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly**  
**1 5 10 15**  
 35  
 <210> 34  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético  
 45  
 <400> 34  
**Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu**  
**1 5 10 15**  
**Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
**20 25 30**  
 <210> 35

ES 2 541 726 T3

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <400> 35

**Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10**

10 <210> 36  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <400> 36

**Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**

**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser**  
**20 25**

25 <210> 37  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <400> 37

**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met**  
**1 5 10**

35 <210> 38  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

45 <400> 38

**Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu**  
**1 5 10 15**

**Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala**  
**20 25 30**

50 <210> 39  
 <211> 30  
 <212> PRT

ES 2 541 726 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 39

**Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu**  
**1 5 10 15**

**Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

10

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 40

**Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln**  
**1 5 10 15**

**Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser**  
**20 25 30**

20

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

30

<400> 41

**Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly**  
**1 5 10**

35

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 42

**Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys**  
**1 5 10 15**

**Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
**20 25 30**

45

ES 2 541 726 T3

5 <210> 43  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 43

**Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln**  
**1 5 10 15**

**Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser**  
**20 25**

15 <210> 44  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <400> 44

**Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile**  
**1 5 10**

25 <210> 45  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 45

**Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys**  
**1 5 10 15**

**Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala**  
**20 25 30**

35 <210> 46  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

45 <400> 46

ES 2 541 726 T3

**Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys**  
**1 5 10 15**

**Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

5 <210> 47  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético  
 <400> 47

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly**  
**1 5 10 15**

**Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser**  
**20 25 30**

15 <210> 48  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <400> 48

**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser**  
**1 5 10**

25 <210> 49  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético  
 35 <400> 49

**Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
**20 25 30**

40 <210> 50  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 541 726 T3

<400> 50

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly**  
**1 5 10 15**

**Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser**  
**20 25**

5 <210> 51  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 51

**Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val**  
**1 5 10**

15 <210> 52  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 52

**Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala**  
**20 25 30**

30 <210> 53  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 53

**Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

40 <210> 54  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45

ES 2 541 726 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 54

5

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly**  
**1 5 10 15**

**Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys**  
**20 25 30**

<210> 55

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 55

**Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg**  
**20 25 30**

20

<210> 56

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 56

**Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

30

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser**  
**20 25 30**

<210> 57

<211> 32

35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

40

<400> 57

ES 2 541 726 T3

**Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
**20 25 30**

5 <210> 58  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético  
<400> 58

**Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala**  
**20 25 30**

15 <210> 59  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético  
<400> 59

**Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys**

25 **20 25 30**

30 <210> 60  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <400> 60

**Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**  
**1 5 10 15**

**Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys**  
**20**



ES 2 541 726 T3

5 <210> 61  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 61

**Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr**  
 1 5 10 15

15 <210> 62  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20 <400> 62

**Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
 1 5 10 15

**Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys**  
 20 25 30

25 <210> 63  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 63

**Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
 1 5 10

35 <210> 64  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <400> 64

**Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly**  
 1 5 10 15

**Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys**  
 20

5 <210> 65  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 65

**Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr**  
 1 5 10 15

15 <210> 66  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 66

**Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
 1 5 10 15

**Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys**  
 20 25 30

25 <210> 67  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 67

**Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly**  
 1 5 10 15

**Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys**  
 20

35 <210> 68  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <400> 68

**Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr**  
 1 5 10 15

ES 2 541 726 T3

<210> 69  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 69

10

**Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
**1 5 10 15**

**Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

<210> 70  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20

<400> 70

**Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly**  
**1 5 10 15**

**Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys**  
**20**

25

<210> 71  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 71

**Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr**  
**1 5 10 15**

35

<210> 72  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

45

<400> 72

ES 2 541 726 T3

**Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
**1 5 10 15**

**Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

- 5 <210> 73
- <211> 396
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
  
- 10 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de Antígeno Etiquetado Notch2 humano NRR
  
- <400> 73

ES 2 541 726 T3

Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Asp Val Cys Pro Gln Met Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser Asn Met Pro Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Ala Arg Cys Gln Ser  
 35 40 45  
 Ser Cys Gly Gln Val Lys Cys Arg Lys Gly Glu Gln Cys Val His Thr  
 50 55 60  
 Ala Ser Gly Pro Arg Cys Phe Cys Pro Ser Pro Arg Asp Cys Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln His Gly Gly Ser Cys His Pro Gln  
 85 90 95  
 Arg Gln Pro Pro Tyr Tyr Ser Cys Gln Cys Ala Pro Pro Phe Ser Gly  
 100 105 110  
 Ser Arg Cys Glu Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Thr Pro Pro Ala Thr  
 115 120 125  
 Cys Leu Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly Val Cys Asp  
 130 135 140  
 Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro Leu Pro Cys  
 165 170 175  
 Trp Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn Thr Val Glu  
 180 185 190

Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Gly Asn Ser Lys Thr Cys Lys  
 195 200 205  
 Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His Cys Asn Gln  
 210 215 220  
 Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Val Ile Val Val Leu  
 245 250 255  
 Met Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg Ser Phe Leu Arg Ala  
 260 265 270  
 Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg Ile Lys Arg Asp Ser Gln  
 275 280 285  
 Gly Glu Leu Met Val Tyr Pro Tyr Tyr Gly Glu Lys Ser Ala Ala Met  
 290 295 300  
 Lys Lys Gln Arg Met Thr Arg Arg Ser Leu Pro Gly Glu Gln Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Val Ala Gly Ser Lys Val Phe Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys  
 325 330 335  
 Val Gln Asp Ser Asp His Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala Ala Ala Ala  
 340 345 350  
 Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Val  
 355 360 365  
 Ser Val Val Ser Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg Thr Glu Phe Gly Leu  
 370 375 380  
 Val Pro Arg Gly Ser Gly His His His His His His  
 385 390 395

<210> 74  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético de Antígeno Etiquetado Notch2 de ratón NRR

<400> 74

Ala Asp Val Cys Pro Gln Lys Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala

1				5							10					15
Val	Ala	Ser	Asn	Met	Pro	Asp	Gly	Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Pro	Pro	Gly	
			20					25					30			
Phe	Ser	Gly	Ala	Arg	Cys	Gln	Ser	Ser	Cys	Gly	Gln	Val	Lys	Cys	Arg	
		35					40					45				
Arg	Gly	Glu	Gln	Cys	Ile	His	Thr	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Cys	Phe	Cys	
	50					55					60					
Leu	Asn	Pro	Lys	Asp	Cys	Glu	Ser	Gly	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys	Gln	
65					70					75					80	
His	Gly	Gly	Thr	Cys	Tyr	Pro	Gln	Arg	Gln	Pro	Pro	His	Tyr	Ser	Cys	
				85					90					95		
Arg	Cys	Pro	Pro	Ser	Phe	Gly	Gly	Ser	His	Cys	Glu	Leu	Tyr	Thr	Ala	
			100					105						110		
Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala	Thr	Cys	Gln	Ser	Gln	Tyr	Cys	Ala	Asp	
		115					120					125				
Lys	Ala	Arg	Asp	Gly	Ile	Cys	Asp	Glu	Ala	Cys	Asn	Ser	His	Ala	Cys	
	130					135					140					
Gln	Trp	Asp	Gly	Gly	Asp	Cys	Ser	Leu	Thr	Met	Glu	Asp	Pro	Trp	Ala	
145					150					155					160	
Asn	Cys	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Gln	Cys	
				165					170					175		
Asp	Glu	Gln	Cys	Asn	Thr	Ala	Glu	Cys	Leu	Phe	Asp	Asn	Phe	Glu	Cys	
			180					185					190			
Gln	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	Cys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Cys	Ala	Asp	His	
		195					200					205				
Phe	Lys	Asp	Asn	His	Cys	Asp	Gln	Gly	Cys	Asn	Ser	Glu	Glu	Cys	Gly	
	210					215					220					
Trp	Asp	Gly	Leu	Asp	Cys	Ala	Ser	Asp	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Ala	Glu	
225					230					235					240	
Gly	Thr	Leu	Ile	Ile	Val	Val	Leu	Leu	Pro	Pro	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	
				245					250						255	
Asp	Ser	Arg	Ser	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	His	Thr	Asn	
			260					265					270			

ES 2 541 726 T3

**Leu Arg Ile Lys Gln Asp Ser Gln Gly Ala Leu Met Val Tyr Pro Tyr**  
 275 280 285  
**Phe Gly Glu Lys Ser Ala Ala Met Lys Lys Gln Lys Met Thr Arg Arg**  
 290 300  
**Ser Leu Pro Glu Glu Gln Glu Gln Glu Gln Glu Val Ile Gly Ser Lys**  
 305 310 315 320  
**Ile Phe Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp Gln**  
 325 330 335  
**Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala**  
 340 345 350  
**Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Phe Ser Glu Leu**  
 355 360 365  
**Glu Ser Pro Arg Asn Ala Arg Arg Ala Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp**  
 370 375 380  
**Asp Asp Asp Lys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln**  
 385 390

5

<210> 75  
 <211> 2471  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 75



ES 2 541 726 T3

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Cys Cys Ala Ala Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Asp Gly Tyr  
 20 25 30

Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Met Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr  
 35 40 45

Gly Tyr Cys Lys Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His  
 50 55 60

Arg Asp Pro Cys Glu Lys Asn Arg Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Val  
 65 70 75 80

Ala Gln Ala Met Leu Gly Lys Ala Thr Cys Arg Cys Ala Ser Gly Phe  
 85 90 95

Thr Gly Glu Asp Cys Gln Tyr Ser Thr Ser His Pro Cys Phe Val Ser

	100		105		110
Arg Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys His Met Leu Ser Arg Asp Thr	115		120		125
Tyr Glu Cys Thr Cys Gln Val Gly Phe Thr Gly Lys Glu Cys Gln Trp	130		135		140
Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Ala Asn Gly Ser Thr Cys Thr	145		150	155	160
Thr Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Lys Cys Leu Thr Gly Phe Thr Gly		165		170	175
Gln Lys Cys Glu Thr Asp Val Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly His Cys		180	185		190
Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Gln		195	200		205
Cys Pro Gln Gly Phe Thr Gly Gln Tyr Cys Asp Ser Leu Tyr Val Pro	210		215	220	
Cys Ala Pro Ser Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys Arg Gln Thr Gly	225		230	235	240
Asp Phe Thr Phe Glu Cys Asn Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Thr		245		250	255
Cys Glu Arg Asn Ile Asp Asp Cys Pro Asn His Arg Cys Gln Asn Gly		260	265		270
Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro		275	280		285
Gln Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Leu Leu	290		295	300	
Gln Pro Asn Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ala Asn Arg Asn Gly	305		310	315	320
Gly Tyr Gly Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Ser Gly Asp Asp Cys Ser		325		330	335
Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Phe Ala Ser Cys Thr Pro Gly Ser Thr		340		345	350
Cys Ile Asp Arg Val Ala Ser Phe Ser Cys Met Cys Pro Glu Gly Lys	355		360		365

Ala Gly Leu Leu Cys His Leu Asp Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys  
 370 375 380

His Lys Gly Ala Leu Cys Asp Thr Asn Pro Leu Asn Gly Gln Tyr Ile  
 385 390 395 400

Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asp Cys Thr Glu Asp Val  
 405 410 415

Asp Glu Cys Ala Met Ala Asn Ser Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys  
 420 425 430

Cys Val Asn Thr Asp Gly Ala Phe His Cys Glu Cys Leu Lys Gly Tyr  
 435 440 445

Ala Gly Pro Arg Cys Glu Met Asp Ile Asn Glu Cys His Ser Asp Pro  
 450 455 460

Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Lys Ile Gly Gly Phe Thr Cys  
 465 470 475 480

Leu Cys Met Pro Gly Phe Lys Gly Val His Cys Glu Leu Glu Ile Asn  
 485 490 495

Glu Cys Gln Ser Asn Pro Cys Val Asn Asn Gly Gln Cys Val Asp Lys  
 500 505 510 515

Val Asn Arg Phe Gln Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Val  
 515 520 525

Cys Gln Ile Asp Ile Asp Asp Cys Ser Ser Thr Pro Cys Leu Asn Gly  
 530 535 540

Ala Lys Cys Ile Asp His Pro Asn Gly Tyr Glu Cys Gln Cys Ala Thr  
 545 550 555 560

Gly Phe Thr Gly Val Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asn Cys Asp Pro  
 565 570 575

Asp Pro Cys His His Gly Gln Cys Gln Asp Gly Ile Asp Ser Tyr Thr  
 580 585 590

Cys Ile Cys Asn Pro Gly Tyr Met Gly Ala Ile Cys Ser Asp Gln Ile  
 595 600 605

Asp Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Cys Leu Asn Asp Gly Arg Cys Ile Asp  
 610 615 620

Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys Asn Cys Gln Pro Gly Thr Ser Gly Val  
 625 630 635 640

Asn Cys Glu Ile Asn Phe Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Ile His  
 645 650 655

Gly Ile Cys Met Asp Gly Ile Asn Arg Tyr Ser Cys Val Cys Ser Pro  
 660 665 670

Gly Phe Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser  
 675 680 685

Asn Pro Cys Arg Lys Gly Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Asn Gly Phe  
 690 695 700

Arg Cys Ile Cys Pro Glu Gly Pro His His Pro Ser Cys Tyr Ser Gln  
 705 710 715 720

Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Asn Cys Thr Gly  
 725 730 735

Gly Leu Ser Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Asp Ala Gly Trp Val Gly Ile  
 740 745 750

Asn Cys Glu Val Asp Lys Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gln Asn  
 755 760 765

Gly Gly Thr Cys Asp Asn Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Thr Cys Lys  
 770 775 780

Lys Gly Phe Lys Gly Tyr Asn Cys Gln Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala  
 785 790 795 800

Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gln Gly Thr Cys Phe Asp Asp Ile Ser Gly  
 805 810 815

Tyr Thr Cys His Cys Val Leu Pro Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr  
 820 825 830

Val Leu Ala Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Glu Asn Ala Ala Val Cys  
 835 840 845

Lys Glu Ser Pro Asn Phe Glu Ser Tyr Thr Cys Leu Cys Ala Pro Gly  
 850 855 860

Trp Gln Gly Gln Arg Cys Thr Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ile Ser Lys  
 865 870 875 880

Pro Cys Met Asn His Gly Leu Cys His Asn Thr Gln Gly Ser Tyr Met  
 885 890 895

Cys Glu Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Met Asp Cys Glu Glu Asp Ile  
 900 905 910

Asp Asp Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Met Asp  
 915 920 925

Gly Val Asn Thr Phe Ser Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Asp  
 930 935 940

Lys Cys Gln Thr Asp Met Asn Glu Cys Leu Ser Glu Pro Cys Lys Asn  
 945 950 955 960

Gly Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Val Asn Ser Tyr Thr Cys Lys Cys Gln  
 965 970 975

Ala Gly Phe Asp Gly Val His Cys Glu Asn Asn Ile Asn Glu Cys Thr  
 980 985 990

Glu Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser  
 995 1000 1005

Phe Ser Cys Leu Cys Pro Val Gly Phe Thr Gly Ser Phe Cys Leu  
 1010 1015 1020

His Glu Ile Asn Glu Cys Ser Ser His Pro Cys Leu Asn Glu Gly  
 1025 1030 1035

Thr Cys Val Asp Gly Leu Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Cys Pro Leu  
 1040 1045 1050

Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr Leu Val Asn Leu Cys Ser  
 1055 1060 1065

Arg Ser Pro Cys Lys Asn Lys Gly Thr Cys Val Gln Lys Lys Ala  
 1070 1075 1080

Glu Ser Gln Cys Leu Cys Pro Ser Gly Trp Ala Gly Ala Tyr Cys  
 1085 1090 1095

Asp Val Pro Asn Val Ser Cys Asp Ile Ala Ala Ser Arg Arg Gly  
 1100 1105 1110

Val Leu Val Glu His Leu Cys Gln His Ser Gly Val Cys Ile Asn  
 1115 1120 1125

Ala Gly Asn Thr His Tyr Cys Gln Cys Pro Leu Gly Tyr Thr Gly

ES 2 541 726 T3

1130						1135						1140			
Ser Tyr Cys Glu Glu Gln Leu Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys															
1145						1150						1155			
Gln His Gly Ala Thr Cys Ser Asp Phe Ile Gly Gly Tyr Arg Cys															
1160						1165						1170			
Glu Cys Val Pro Gly Tyr Gln Gly Val Asn Cys Glu Tyr Glu Val															
1175						1180						1185			
Asp Glu Cys Gln Asn Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile															
1190						1195						1200			
Asp Leu Val Asn His Phe Lys Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Arg															
1205						1210						1215			
Gly Leu Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Arg Gly Pro															
1220						1225						1230			
His Cys Leu Asn Gly Gly Gln Cys Met Asp Arg Ile Gly Gly Tyr															
1235						1240						1245			
Ser Cys Arg Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Glu Arg Cys Glu Gly															
1250						1255						1260			
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ser Ser Glu Gly Ser															
1265						1270						1275			
Leu Asp Cys Ile Gln Leu Thr Asn Asp Tyr Leu Cys Val Cys Arg															
1280						1285						1290			
Ser Ala Phe Thr Gly Arg His Cys Glu Thr Phe Val Asp Val Cys															
1295						1300						1305			
Pro Gln Met Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser															
1310						1315						1320			
Asn Met Pro Asp Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ser															
1325						1330						1335			
Gly Ala Arg Cys Gln Ser Ser Cys Gly Gln Val Lys Cys Arg Lys															
1340						1345						1350			
Gly Glu Gln Cys Val His Thr Ala Ser Gly Pro Arg Cys Phe Cys															
1355						1360						1365			
Pro Ser Pro Arg Asp Cys Glu Ser Gly Cys Ala Ser Ser Pro Cys															
1370						1375						1380			

Gln His Gly Gly Ser Cys His Pro Gln Arg Gln Pro Pro Tyr Tyr  
 1385 1390 1395

Ser Cys Gln Cys Ala Pro Pro Phe Ser Gly Ser Arg Cys Glu Leu  
 1400 1405 1410

Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Thr Pro Pro Ala Thr Cys Leu Ser Gln  
 1415 1420 1425

Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly Val Cys Asp Glu Ala Cys  
 1430 1435 1440

Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Thr  
 1445 1450 1455

Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro Leu Pro Cys Trp  
 1460 1465 1470

Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn Thr Val Glu  
 1475 1480 1485

Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Gly Asn Ser Lys Thr Cys  
 1490 1495 1500

Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His Cys  
 1505 1510 1515

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp  
 1520 1525 1530

Cys Ala Ala Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Val  
 1535 1540 1545

Ile Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg  
 1550 1555 1560

Ser Phe Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg  
 1565 1570 1575

Ile Lys Arg Asp Ser Gln Gly Glu Leu Met Val Tyr Pro Tyr Tyr  
 1580 1585 1590

Gly Glu Lys Ser Ala Ala Met Lys Lys Gln Arg Met Thr Arg Arg  
 1595 1600 1605

Ser Leu Pro Gly Glu Gln Glu Gln Glu Val Ala Gly Ser Lys Val  
 1610 1615 1620

Phe Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp His  
 1625 1630 1635  
 Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His  
 1640 1645 1650  
 Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Val Ser  
 1655 1660 1665  
 Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg Thr Gln Leu Leu Tyr Leu Leu Ala  
 1670 1675 1680  
 Val Ala Val Val Ile Ile Leu Phe Ile Ile Leu Leu Gly Val Ile  
 1685 1690 1695  
 Met Ala Lys Arg Lys Arg Lys His Gly Ser Leu Trp Leu Pro Glu  
 1700 1705 1710  
 Gly Phe Thr Leu Arg Arg Asp Ala Ser Asn His Lys Arg Arg Glu  
 1715 1720 1725  
 Pro Val Gly Gln Asp Ala Val Gly Leu Lys Asn Leu Ser Val Gln  
 1730 1735 1740  
 Val Ser Glu Ala Asn Leu Ile Gly Thr Gly Thr Ser Glu His Trp  
 1745 1750 1755  
 Val Asp Asp Glu Gly Pro Gln Pro Lys Lys Val Lys Ala Glu Asp  
 1760 1765 1770  
 Glu Ala Leu Leu Ser Glu Glu Asp Asp Pro Ile Asp Arg Arg Pro  
 1775 1780 1785  
 Trp Thr Gln Gln His Leu Glu Ala Ala Asp Ile Arg Arg Thr Pro  
 1790 1795 1800  
 Ser Leu Ala Leu Thr Pro Pro Gln Ala Glu Gln Glu Val Asp Val  
 1805 1810 1815  
 Leu Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Cys Thr Pro Leu Met  
 1820 1825 1830  
 Leu Ala Ser Leu Arg Gly Gly Ser Ser Asp Leu Ser Asp Glu Asp  
 1835 1840 1845  
 Glu Asp Ala Glu Asp Ser Ser Ala Asn Ile Ile Thr Asp Leu Val  
 1850 1855 1860



Tyr Gln Gly Ala Ser Leu Gln Ala Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu  
 1865 1870 1875  
 Met Ala Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ala Asp Ala Ala  
 1880 1885 1890  
 Lys Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala Asp Ala Asn Ala Gln Asp Asn  
 1895 1900 1905  
 Met Gly Arg Cys Pro Leu His Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Gln  
 1910 1915 1920  
 Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg Asn Arg Val Thr Asp Leu Asp  
 1925 1930 1935  
 Ala Arg Met Asn Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg  
 1940 1945 1950  
 Leu Ala Val Glu Gly Met Val Ala Glu Leu Ile Asn Cys Gln Ala  
 1955 1960 1965  
 Asp Val Asn Ala Val Asp Asp His Gly Lys Ser Ala Leu His Trp  
 1970 1975 1980  
 Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Glu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Lys  
 1985 1990 1995  
 Asn Gly Ala Asn Arg Asp Met Gln Asp Asn Lys Glu Glu Thr Pro  
 2000 2005 2010  
 Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Ala Ala Lys Ile  
 2015 2020 2025  
 Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp  
 2030 2035 2040  
 Arg Leu Pro Arg Asp Val Ala Arg Asp Arg Met His His Asp Ile  
 2045 2050 2055  
 Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Val Thr Pro Ser Pro Pro Gly  
 2060 2065 2070  
 Thr Val Leu Thr Ser Ala Leu Ser Pro Val Ile Cys Gly Pro Asn  
 2075 2080 2085  
 Arg Ser Phe Leu Ser Leu Lys His Thr Pro Met Gly Lys Lys Ser  
 2090 2095 2100  
 Arg Arg Pro Ser Ala Lys Ser Thr Met Pro Thr Ser Leu Pro Asn

ES 2 541 726 T3

2105						2110						2115			
Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Ala	Lys	Gly	Ser	Arg	Arg	Lys	Lys	
2120						2125					2130				
Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Gln	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	
2135						2140					2145				
Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Pro	His	Thr	Tyr	Val	Ser	Asp	
2150						2155					2160				
Thr	Thr	Ser	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Ser	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Ala	
2165						2170					2175				
Ser	Pro	Asn	Pro	Met	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Val	
2180						2185					2190				
His	Ala	Gln	His	Ala	Leu	Ser	Phe	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Met	Gln	
2195						2200					2205				
Pro	Leu	Ala	His	Gly	Ala	Ser	Thr	Val	Leu	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	
2210						2215					2220				
Leu	Leu	Ser	His	His	His	Ile	Val	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	
2225						2230					2235				
Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Leu	His	Pro	Val	Pro	Val	Pro	Ala	Asp	Trp	
2240						2245					2250				
Met	Asn	Arg	Met	Glu	Val	Asn	Glu	Thr	Gln	Tyr	Asn	Glu	Met	Phe	
2255						2260					2265				
Gly	Met	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Thr	His	Pro	Gly	Ile	Ala	
2270						2275					2280				
Pro	Gln	Ser	Arg	Pro	Pro	Glu	Gly	Lys	His	Ile	Thr	Thr	Pro	Arg	
2285						2290					2295				
Glu	Pro	Leu	Pro	Pro	Ile	Val	Thr	Phe	Gln	Leu	Ile	Pro	Lys	Gly	
2300						2305					2310				
Ser	Ile	Ala	Gln	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro	Gln	Ser	Thr	Cys	
2315						2320					2325				
Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Met	Tyr	Gln	Ile	Pro	
2330						2335					2340				
Glu	Met	Ala	Arg	Leu	Pro	Ser	Val	Ala	Phe	Pro	Thr	Ala	Met	Met	
2345						2350					2355				

Pro Gln Gln Asp Gly Gln Val Ala Gln Thr Ile Leu Pro Ala Tyr  
 2360 2365 2370

His Pro Phe Pro Ala Ser Val Gly Lys Tyr Pro Thr Pro Pro Ser  
 2375 2380 2385

Gln His Ser Tyr Ala Ser Ser Asn Ala Ala Glu Arg Thr Pro Ser  
 2390 2395 2400

His Ser Gly His Leu Gln Gly Glu His Pro Tyr Leu Thr Pro Ser  
 2405 2410 2415

Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Ala  
 2420 2425 2430

Ser Asp Trp Ser Asp Val Thr Thr Ser Pro Thr Pro Gly Gly Ala  
 2435 2440 2445

Gly Gly Gly Gln Arg Gly Pro Gly Thr His Met Ser Glu Pro Pro  
 2450 2455 2460

His Asn Asn Met Gln Val Tyr Ala  
 2465 2470

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une al dominio de Repetición de Lin12/Notch (LNR)-A y al dominio de heterodimerización (HD)-C de la región reguladora negativa (NRR) de Notch2 e inhibe la actividad de Notch2, en el que el anticuerpo se une a NRR de Notch2 de ser humano y ratón con una Kd de < 10 nM y en el que el anticuerpo comprende una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado entre las SEC ID N°: 1-2; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5; una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 6-9; una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 11-13; y una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 15-18.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo no se une significativamente a un miembro de la familia Notch distinto de Notch2.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, la HVR- L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15.
4. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la HVR- L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16.
5. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la HVR- L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17.
6. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, la HVR- L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9, la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13, y la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18.
7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además al menos una región marco conservada seleccionada de una región marco conservada de Aceptor 2 variable pesada (VH) humana y una región marco conservada consenso de subgrupo 1 variable ligera (VL) kappa humana.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 20-21 y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 22-25.
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20 y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22.
10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22.
11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21 y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 23-25.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21, y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N°: 23-25.
13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5; una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15.
14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>.

15. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el anticuerpo es humano, humanizado, o quimérico.
- 5 16. Un método para inhibir la actividad de Notch2 *in vitro*, comprendiendo el método exponer a una célula que expresa Notch2 a un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
17. Un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso como medicamento.
- 10 18. Un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en el tratamiento de una neoplasia de células B.
19. Un anticuerpo como en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en el tratamiento del melanoma.

**Secuencias de HYR-H1-Anticuerpo D y anticuerpos madurados por afinidad derivados de Anticuerpo D**

Anticuerpo N°	SEC ID N°:	Número de Kabat													
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35				
D	1	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S				
D-1, D-2, D-3	2	G	Y	T	F	S	S	Y	G	M	S				
Consenso	3	G	Y	S/T	F	S/T	S	Y	G	M	S				

**Secuencias de HVR-H2-Anticuerpo D y anticuerpos madurados por afinidad derivados de Anticuerpo D**

Anticuerpo N°	SEC ID N°:	Número de Kabat																	
		49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
D, D-1, D-2, D-3	4	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

**Secuencias de HVR-H3-Anticuerpo D y anticuerpos madurados por afinidad derivados de Anticuerpo D**

Anticuerpo N°	SEC ID N°:	Número de Kabat												
		95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100K	101	102
D, D-1, D-2, D-3	5	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A	M	D	V

**FIG. 1**

Secuencias de HVR-L1-Anticuerpo D y anticuerpos madurados por afinidad derivados de Anticuerpo D

Anticuerpo N°	SEC ID N°:	Número de Kabat												
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
D	6	R	A	S	O	S	I	S	S	Y	L	A		
D-1	7	R	A	S	Q	S	N	R	R	F	L	A		
D-2	8	R	A	S	Q	S	V	R	S	F	L	A		
D-3	9	R	A	S	O	N	I	K	R	F	L	A		
Consenso	10	R	U	S	Q	S/N	I/NV	S/R/K	S/R	Y/F	L	A		

Secuencias de HVR-L2-Anticuerpo D y anticuerpos madurados por afinidad derivados de Anticuerpo D

Anticuerpo N°	SEC ID N°:	Número de Kabat						
		50	51	52	53	54	55	56
D, D-1	11	G	A	S	S	R	A	S
D-2	12	R	A	S	I	R	A	S
D-3	13	G	A	S	T	R	E	S
Consenso	14	G/R	A	S	S/I/T	R	A/E	S

Secuencias de HVR-L3-Anticuerpo D y anticuerpos madurados por afinidad derivados de Anticuerpo D

Clon N°	SEC ID N°:	Número de Kabat														
		89	90	91	92	93	94	95	96	97						
D	15	Q	Q	Y	Y	S	S	P	L	T						
D-1,	16	Q	Q	Y	Y	I	S	P	L	T						
D-2	17	Q	Q	Y	Y	I	S	P	W	T						
D-3	18	Q	Q	Y	Y	R	S	P	H	T						
Consenso	19	Q	Q	Y	Y	S/I/R	S	P	LW/H	T						

FIG. 2

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36A 35B 36 37 38 39 40 41 42 43

Anticuerpo D EVQLVDSGGGLVQPPGGGLRISCAASGYSFTSFGNS WVRQAFGK  
 Anticuerpo D-1 EVQLVDSGGGLVQPPGGGLRISCAASGYTFSSYGMSS WVRQAFGK  
 Anticuerpo D-2 EVQLVDSGGGLVQPPGGGLRISCAASGYTFSSYGMSS WVRQAFGK  
 Anticuerpo D-3 EVQLVDSGGGLVQPPGGGLRISCAASGYTFSSYGMSS WVRQAFGK

Kabat# 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 A

Anticuerpo D GLEHWVSYIYP YSGATYYA DSVKGRFTISA DTSKN TAYLQMN  
 Anticuerpo D-1 GLEHWVSYIYP YSGATYYA DSVKGRFTISA DTSKN TAYLQMN  
 Anticuerpo D-2 GLEHWVSYIYP YSGATYYA DSVKGRFTISA DTSKN TAYLQMN  
 Anticuerpo D-3 GLEHWVSYIYP YSGATYYA DSVKGRFTISA DTSKN TAYLQMN

Kabat# 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

Anticuerpo D SLRAEDTAVYCCARRHSGLYRISA M D V H G Q G T L V T V S A SECID N°: 20  
 Anticuerpo D-1 SLRAEDTAVYCCARRHSGLYRISA M D V H G Q G T L V T V S A SECID N°: 21  
 Anticuerpo D-2 SLRAEDTAVYCCARRHSGLYRISA M D V H G Q G T L V T V S A SECID N°: 21  
 Anticuerpo D-3 SLRAEDTAVYCCARRHSGLYRISA M D V H G Q G T L V T V S A SECID N°: 21

FIG. 3



Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37								
Anticuerpo D	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q											S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q				
Anticuerpo D-1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q													S	X	R	R	F	L	A	W	Y	Q		
Anticuerpo D-2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q														S	V	R	S	F	L	A	W	Y	Q	
Anticuerpo D-3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q															N	I	K	R	F	L	A	N	Y	Q
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80								
Anticuerpo D	Q	K	P	G	Z	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	F	L	T	I	S	S	L	Q	P								
Anticuerpo D-1	Q	K	P	G	Z	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	F	L	T	I	S	S	L	Q	P										
Anticuerpo D-2	Q	K	P	G	Z	A	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	I	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	F	L	T	I	S	S	L	Q	P										
Anticuerpo D-3	Q	K	P	G	Z	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	F	L	T	I	S	S	L	Q	P										
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																	
Anticuerpo D	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	S	P									L	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	X	R	SEC ID N°:														
Anticuerpo D-1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	I	S	P									L	T	P	G	Q	G	T	X	V	E	I	X	R	SEC ID N°:														
Anticuerpo D-2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	I	S	P									W	T	P	G	Q	G	T	X	V	E	I	X	R	SEC ID N°:														
Anticuerpo D-3	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	R	S	P									E	T	F	G	Q	G	T	X	V	E	I	X	R	SEC ID N°:														

FIG. 4

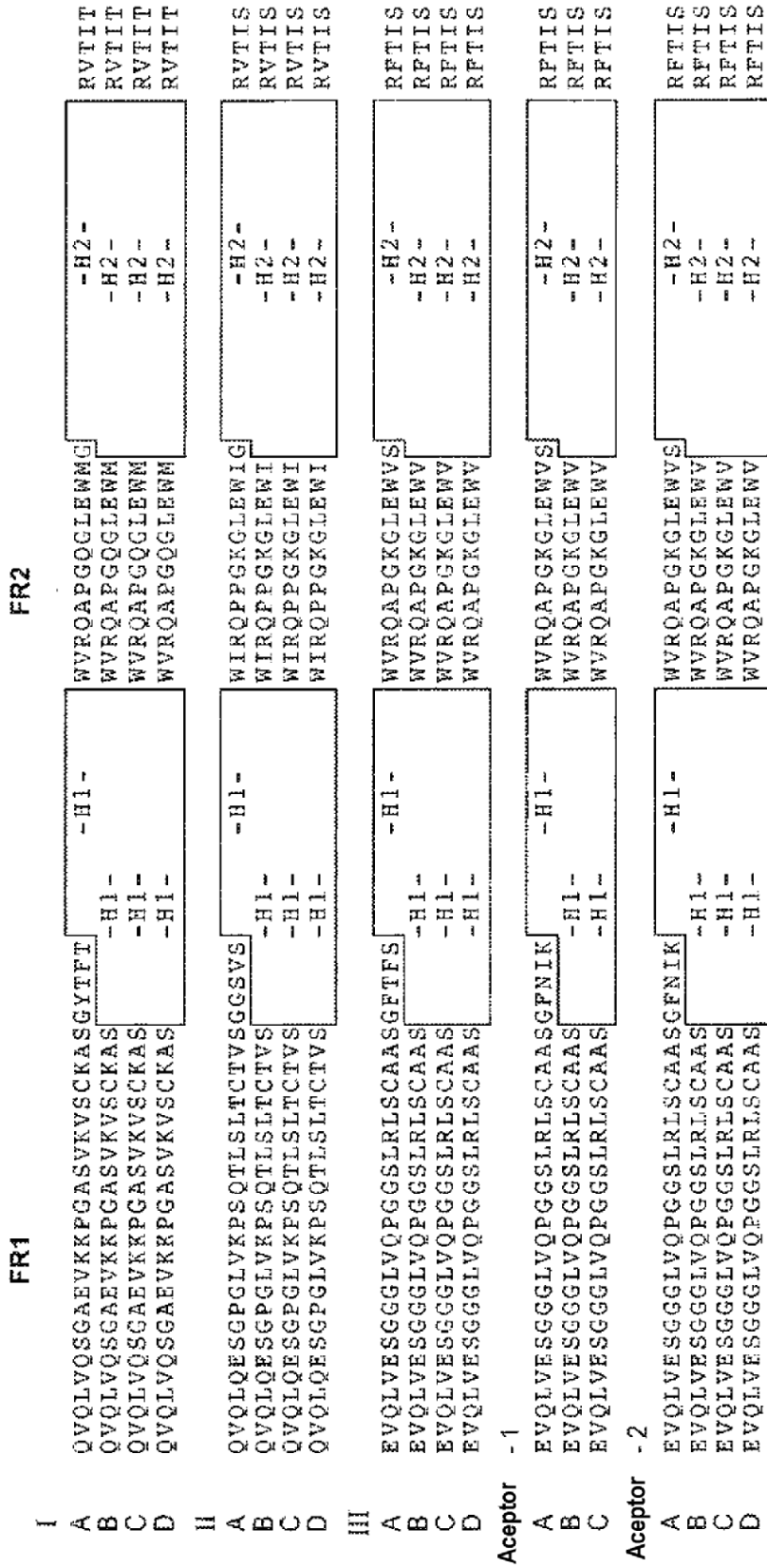


FIG. 5A

		SEC ID N° de	
	FR3	FR4	FR1, FR2, FR3, FR4
I			
A	ADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
B	ADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
C	ADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS
D	ADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS
			SEC ID N°: 32, 33, 34, 35
			SEC ID N°: 36, 37, 34, 35
			SEC ID N°: 36, 37, 38, 35
			SEC ID N°: 36, 37, 39, 35
II			
A	VDTSKNQFSLKLSVTAAD TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
B	VDTSKNQFSLKLSVTAAD TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
C	VDTSKNQFSLKLSVTAAD TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS
D	VDTSKNQFSLKLSVTAAD TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS
			SEC ID N°: 40, 41, 42, 35
			SEC ID N°: 43, 44, 42, 35
			SEC ID N°: 43, 44, 45, 35
			SEC ID N°: 43, 44, 46, 35
III			
A	RDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
B	RDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
C	RDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS
D	RDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS
			SEC ID N°: 47, 48, 49, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 49, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 52, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 53, 35
Aceptor - 1			
A	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
B	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
C	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCS	-H3-	WGQGTLLVTVSS
			SEC ID N°: 54, 48, 55, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 55, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 56, 35
Aceptor - 2			
A	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
B	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS
C	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS
D	ADTTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS
			SEC ID N°: 54, 48, 57, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 57, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 58, 35
			SEC ID N°: 50, 51, 59, 35

FIG. 5B

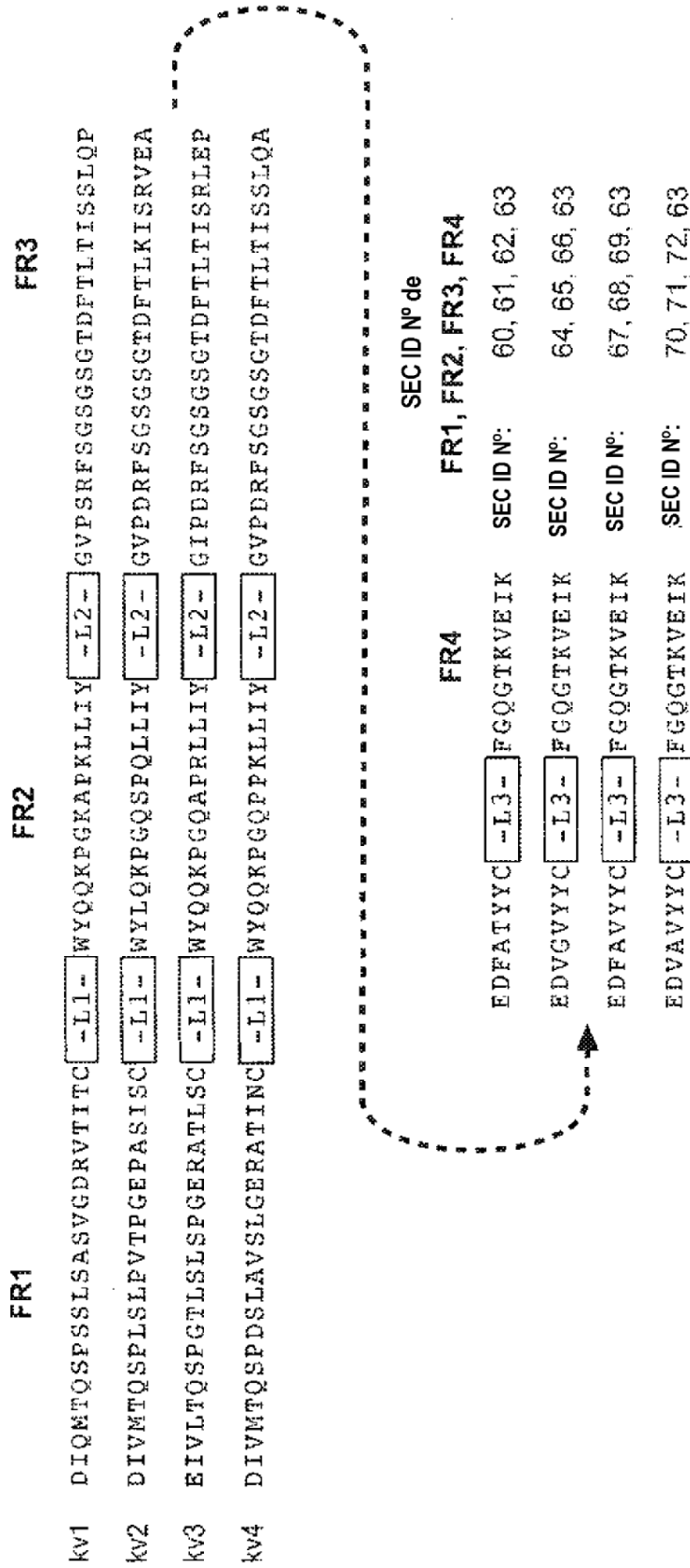


FIG. 6

**Secuencias marco conservadas de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8**

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO: 60)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> (SEC ID Nº: 61)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup> (SEC ID Nº: 30)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEC ID Nº: 63)

**Secuencias marco conservadas de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8**

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEC ID Nº: 50)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> (SEC ID Nº: 51)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> (SEC ID Nº: 59)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEC ID Nº: 35)

**FIG. 7**

**Secuencias marco conservadas de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificadas en las posiciones 66 y 99 (subrayadas)**

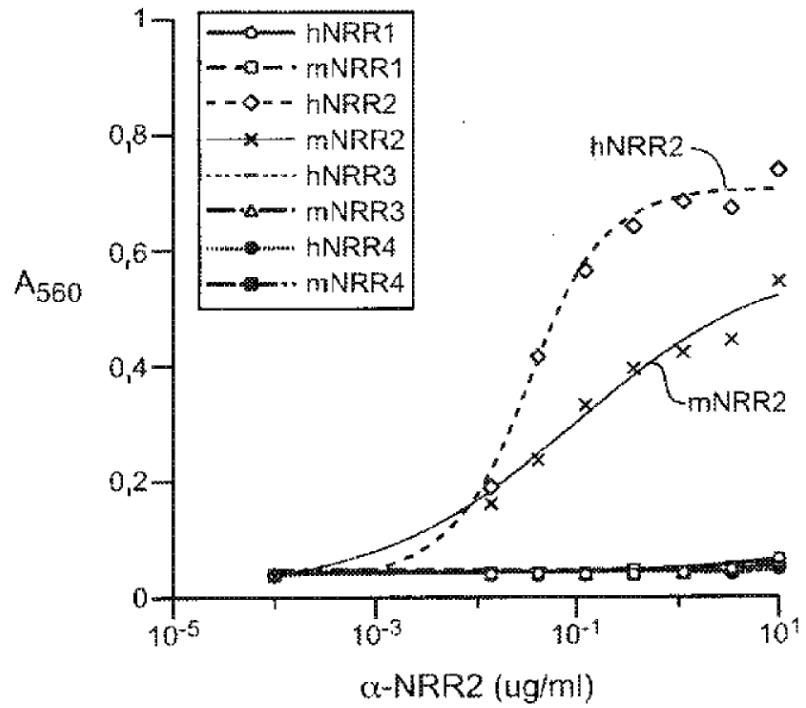
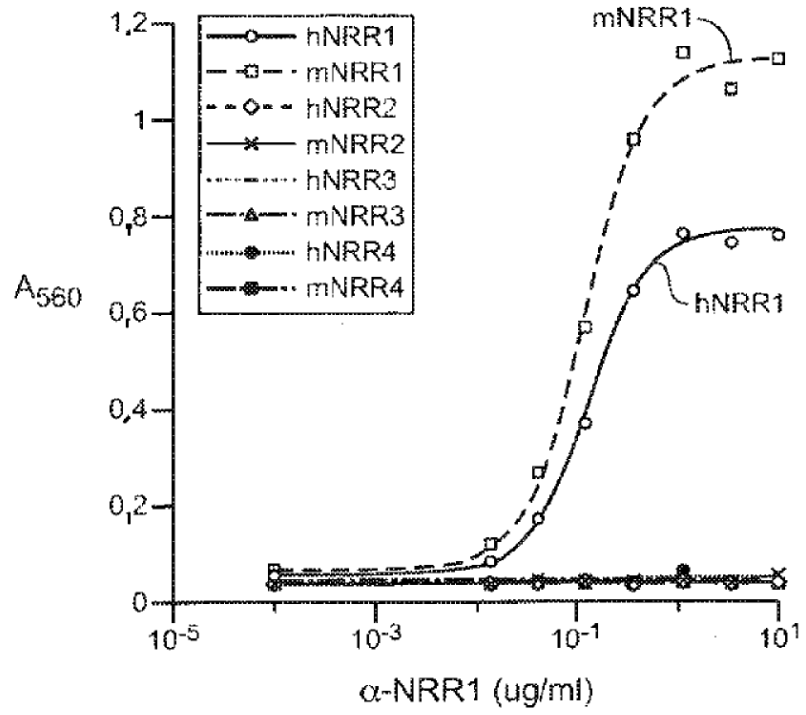
- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEC ID Nº: 60)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> (SEC ID Nº: 61)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>98</sup> (SEC ID Nº: 62)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEC ID Nº: 31)

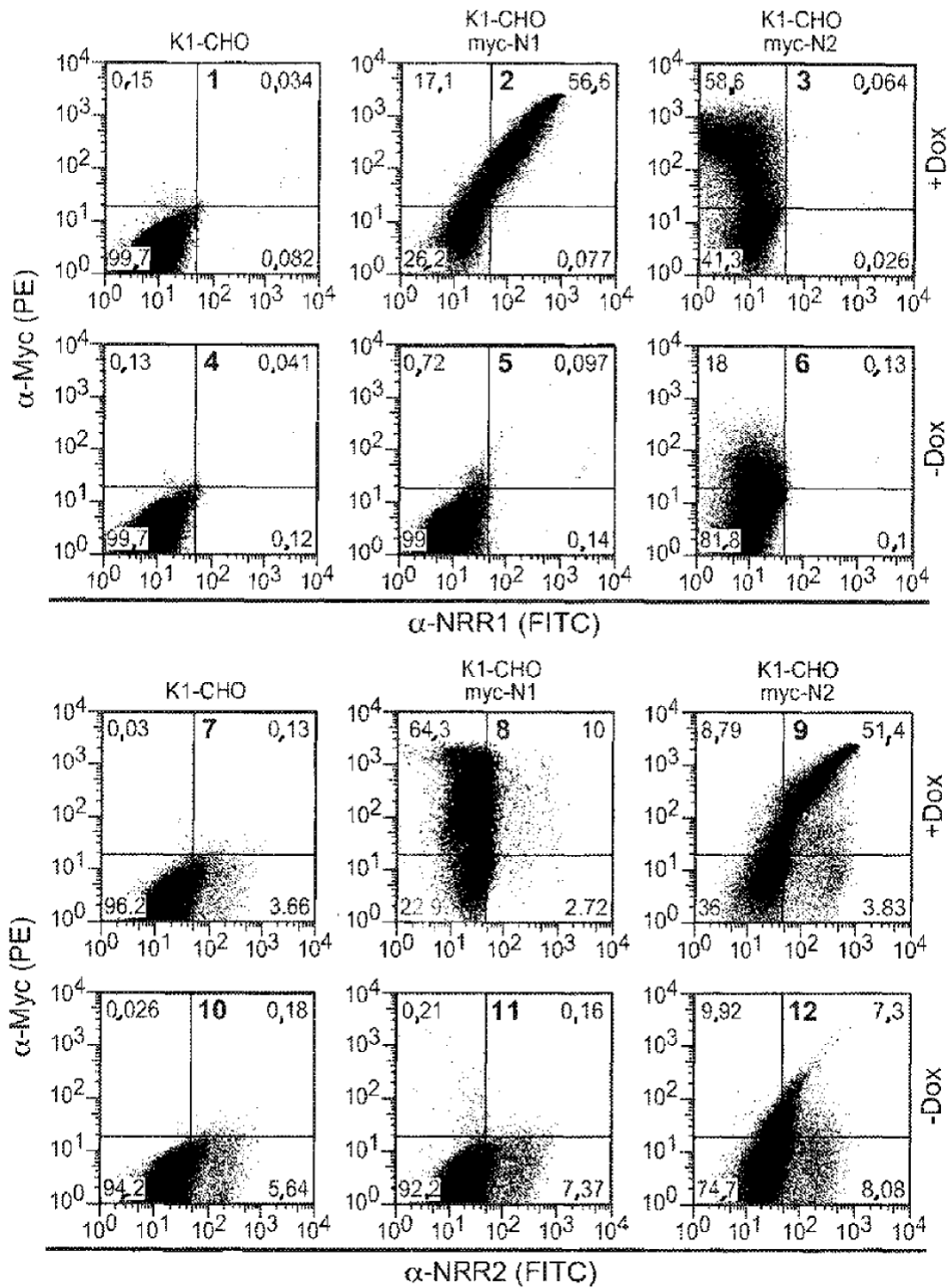
**Secuencias marco conservadas de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificadas en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)**

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEC ID Nº: 50)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> (SEC ID Nº: 51)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> (SEC ID Nº: 53)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEC ID Nº: 35)

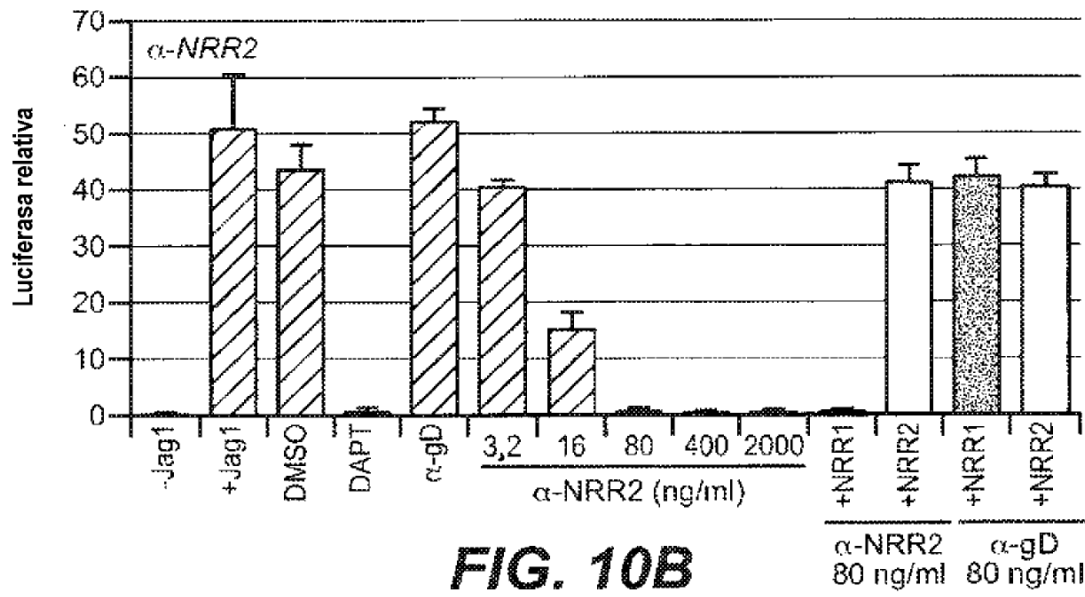
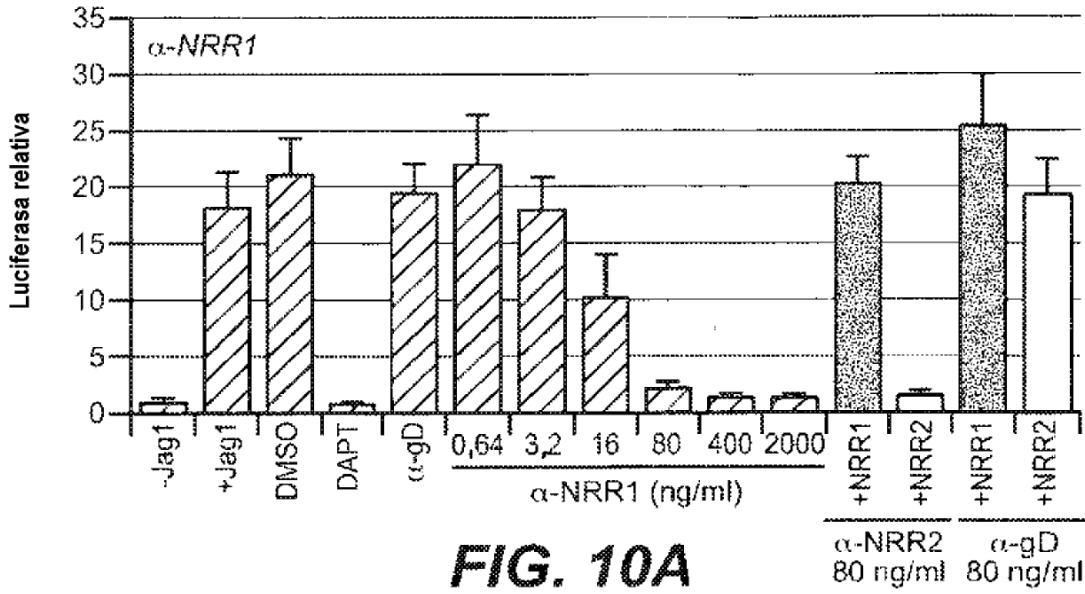
**FIG. 8**

FIG. 9A

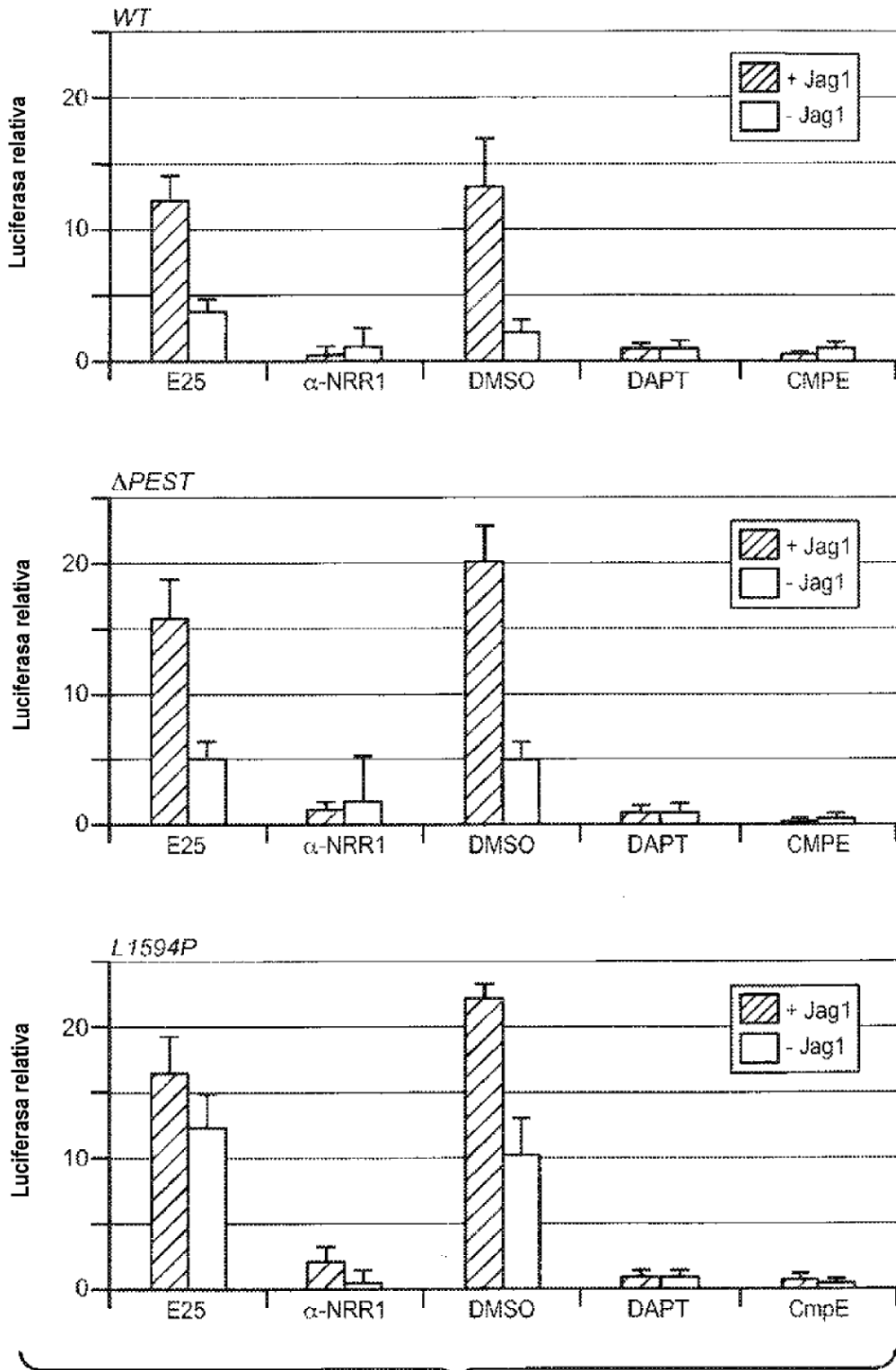




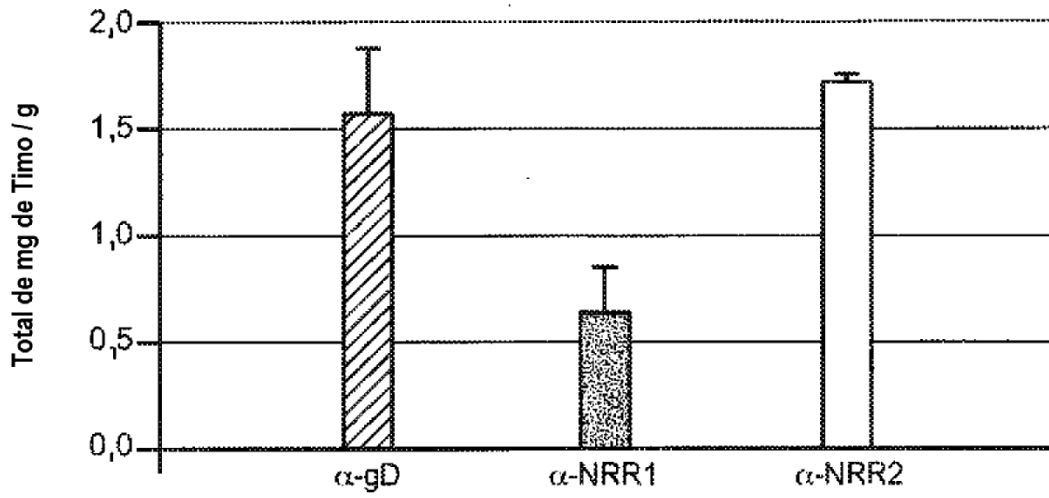
**FIG. 9B**



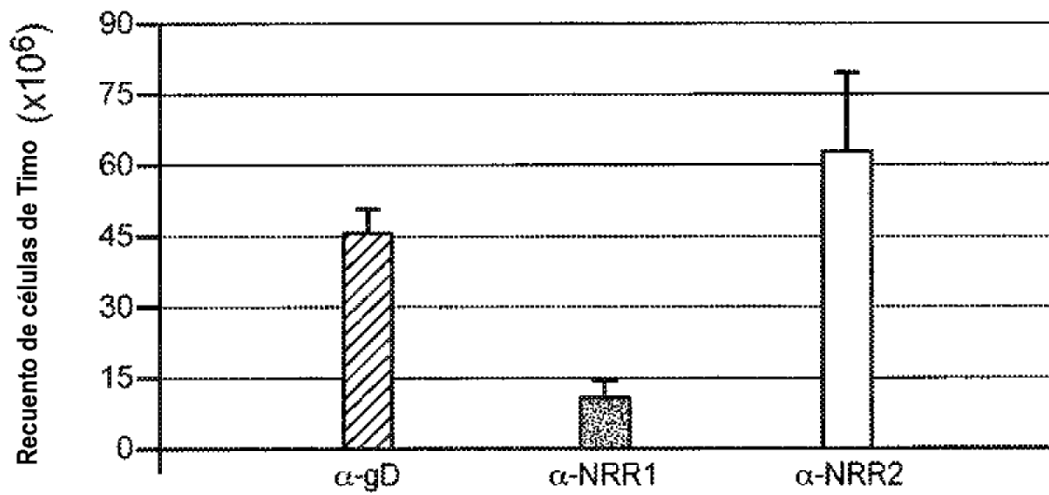




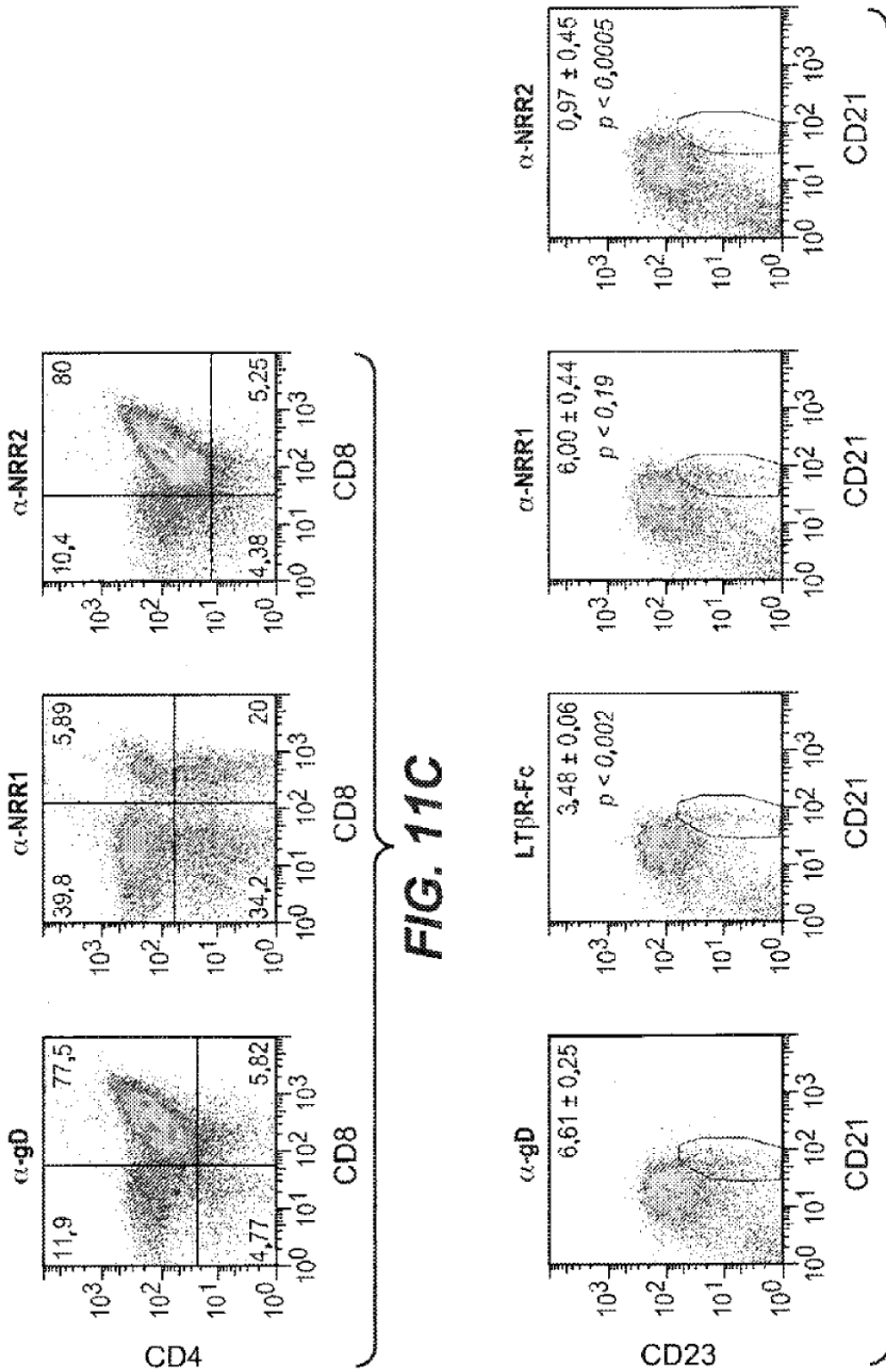
**FIG. 10C**



**FIG. 11A**



**FIG. 11B**



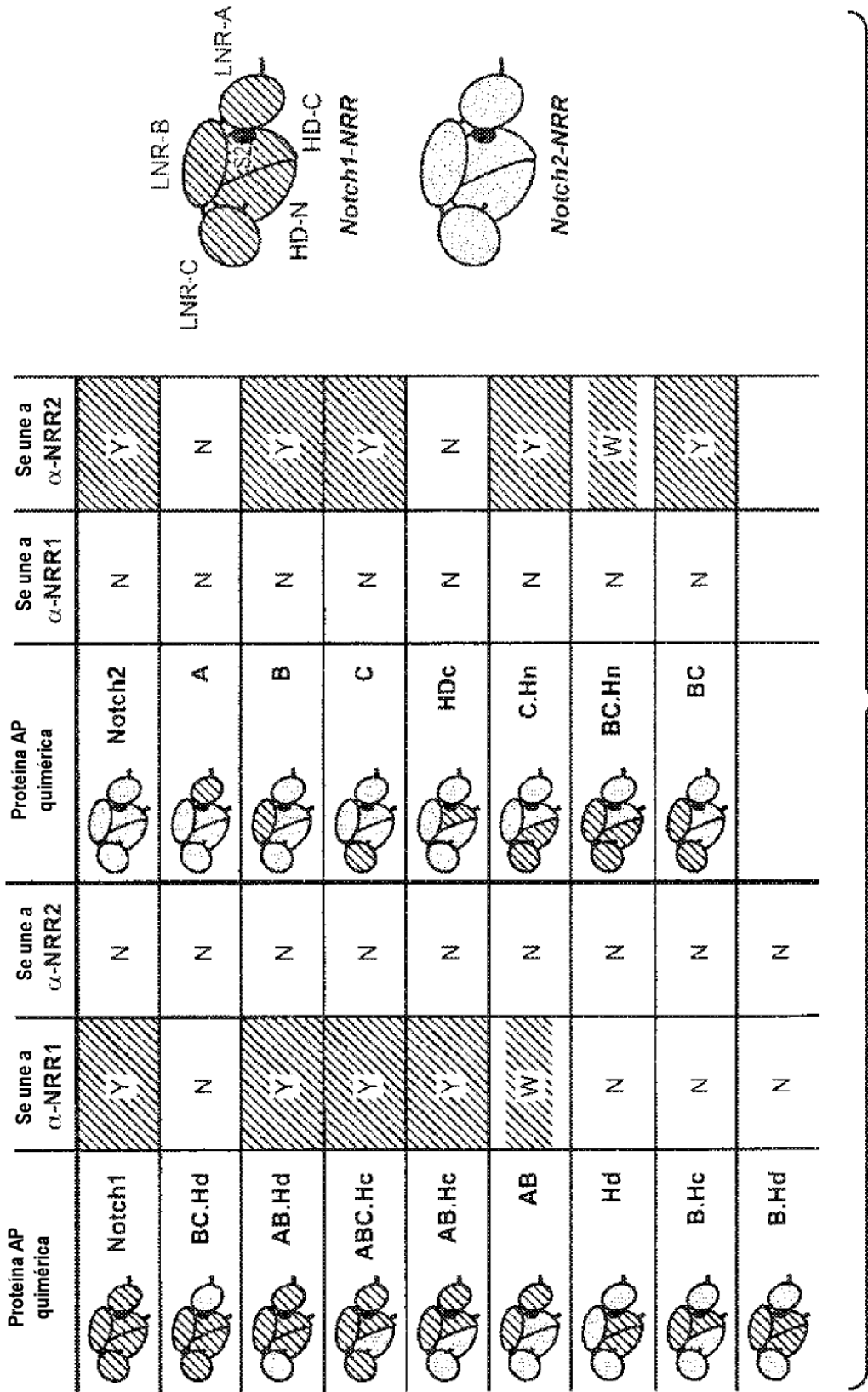
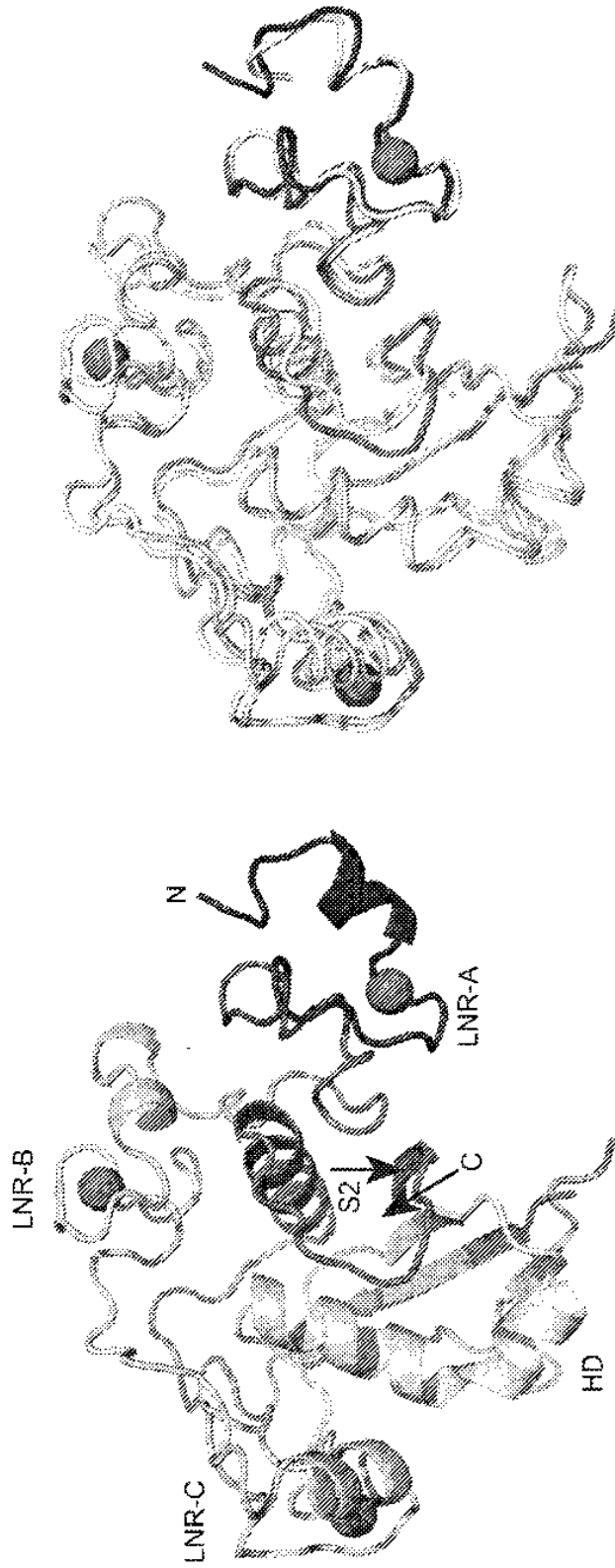


FIG. 12A



**FIG. 12C**

**FIG. 12B**

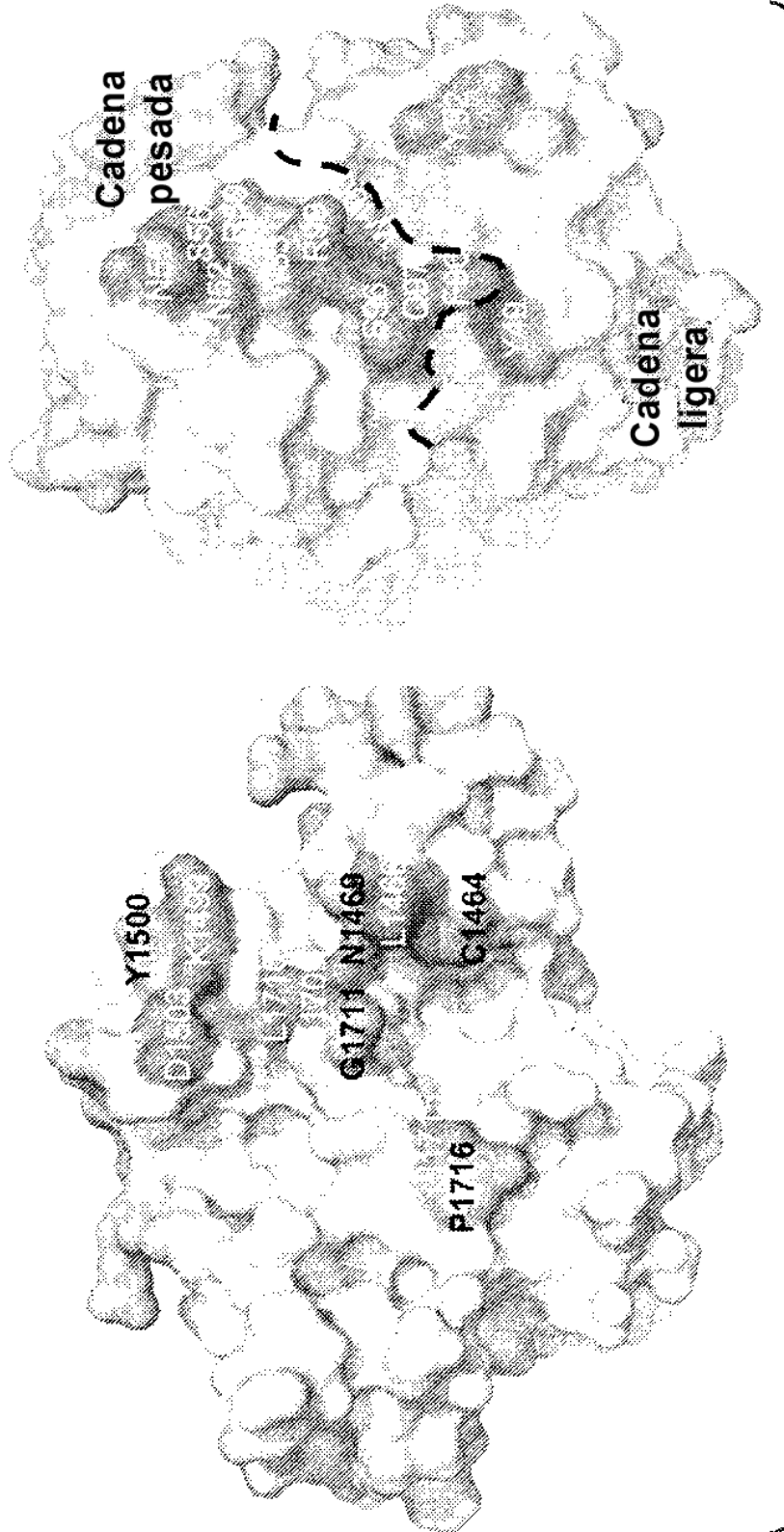
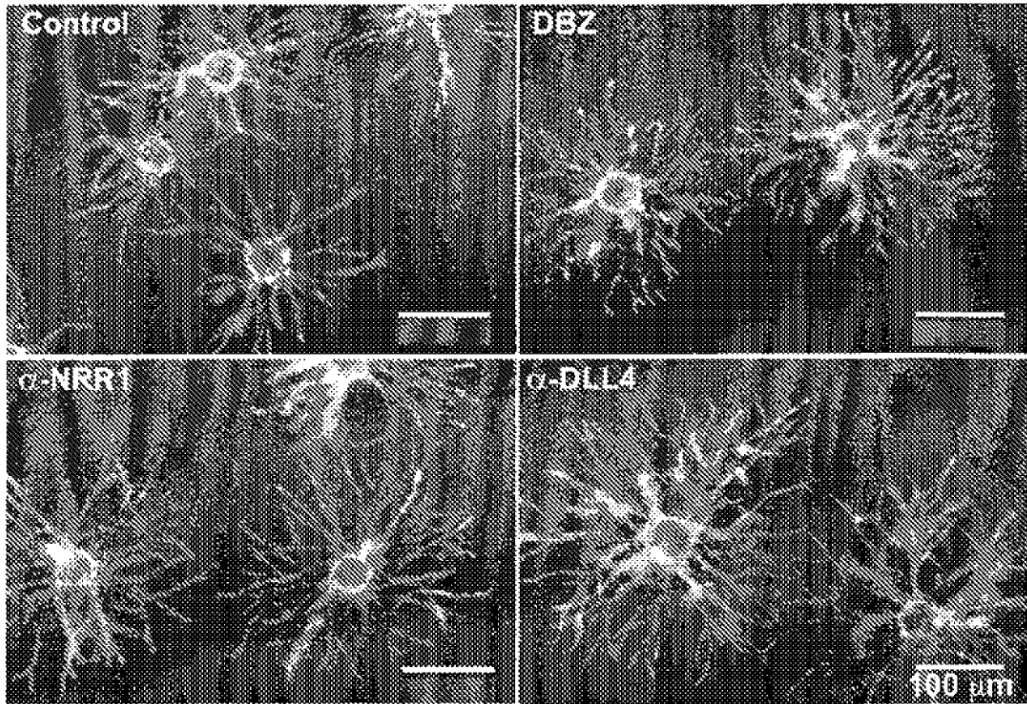
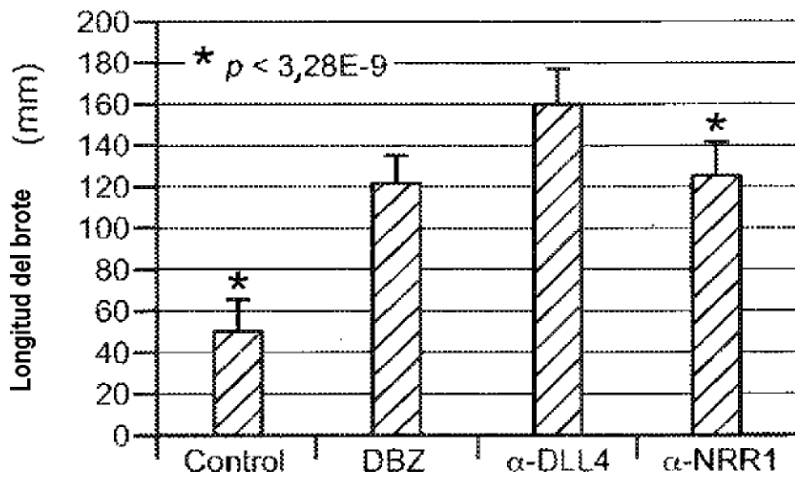


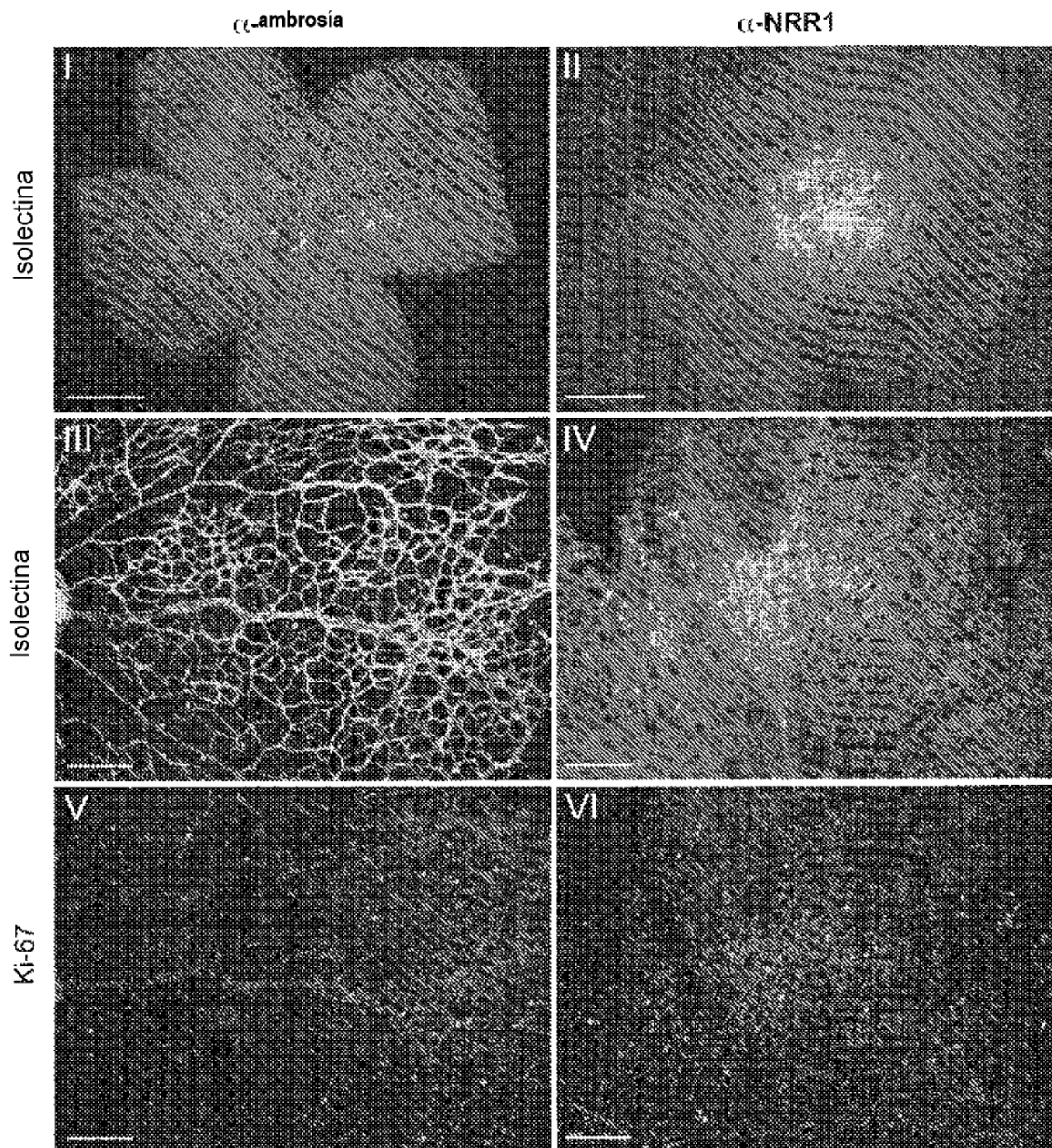
FIG. 12D



**FIG. 13A**

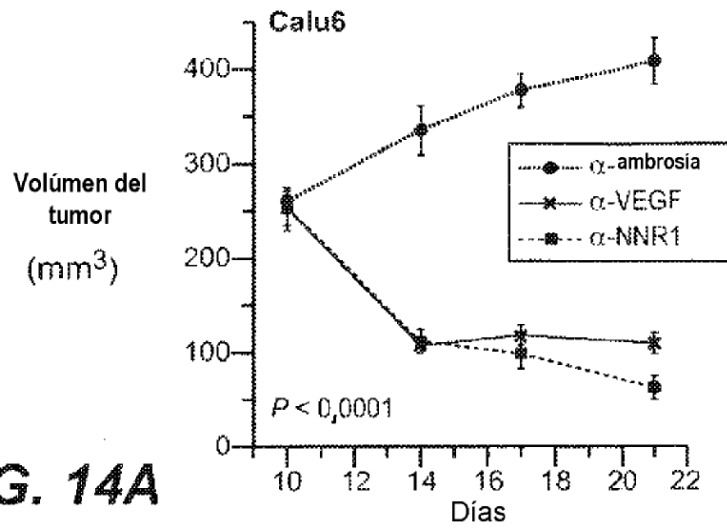


**FIG. 13B**

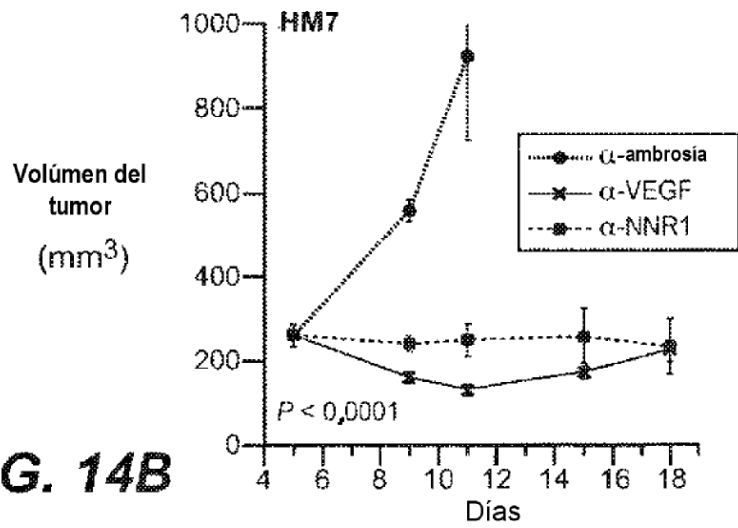


**FIG. 13C**

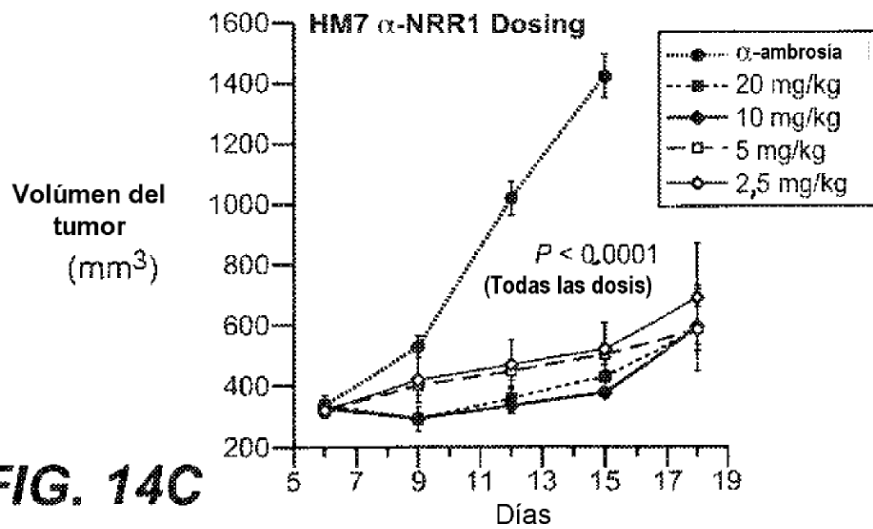




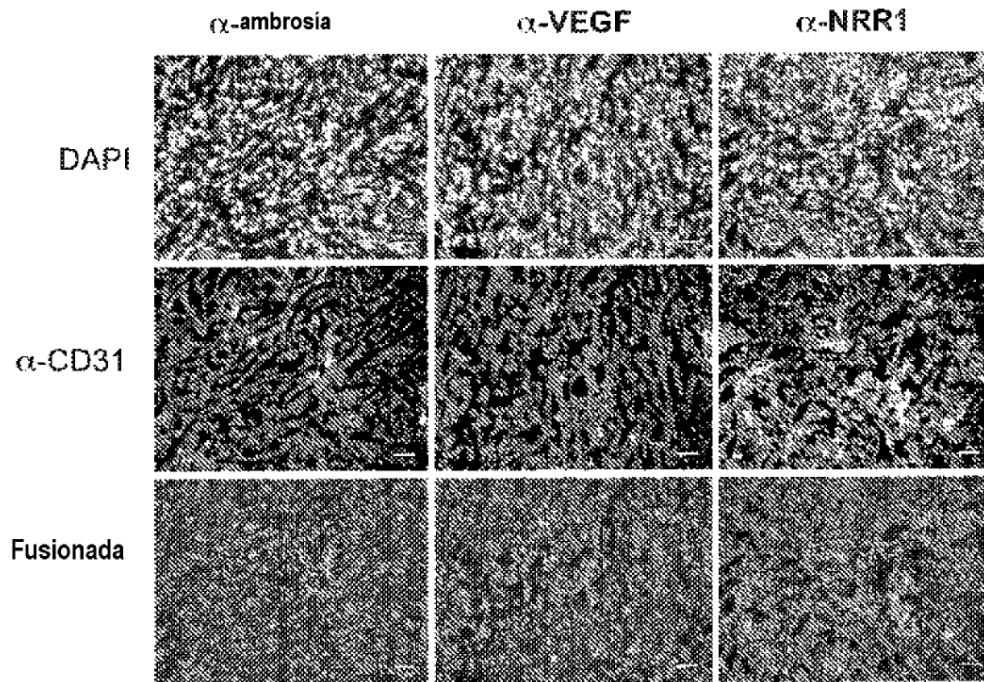
**FIG. 14A**



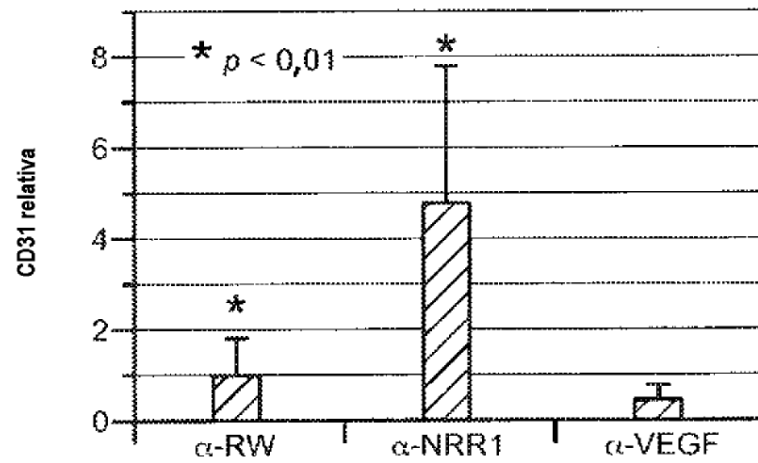
**FIG. 14B**



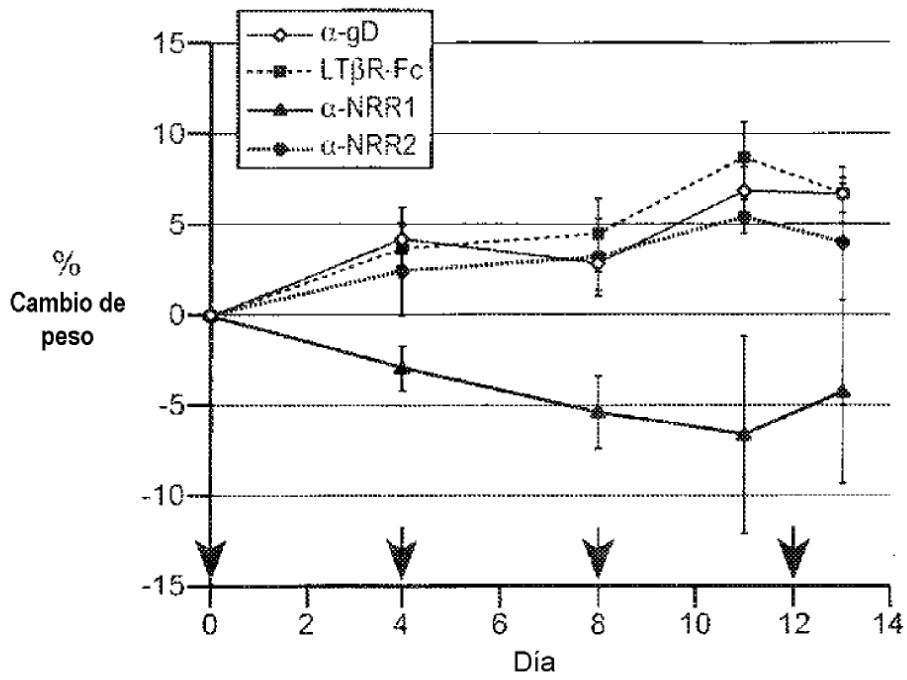
**FIG. 14C**



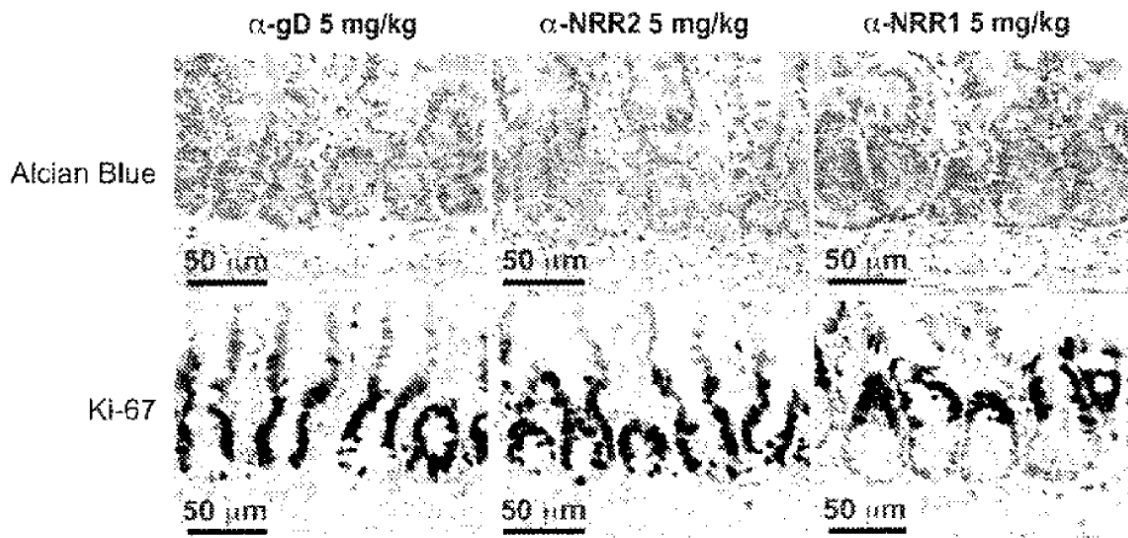
**FIG. 14D**



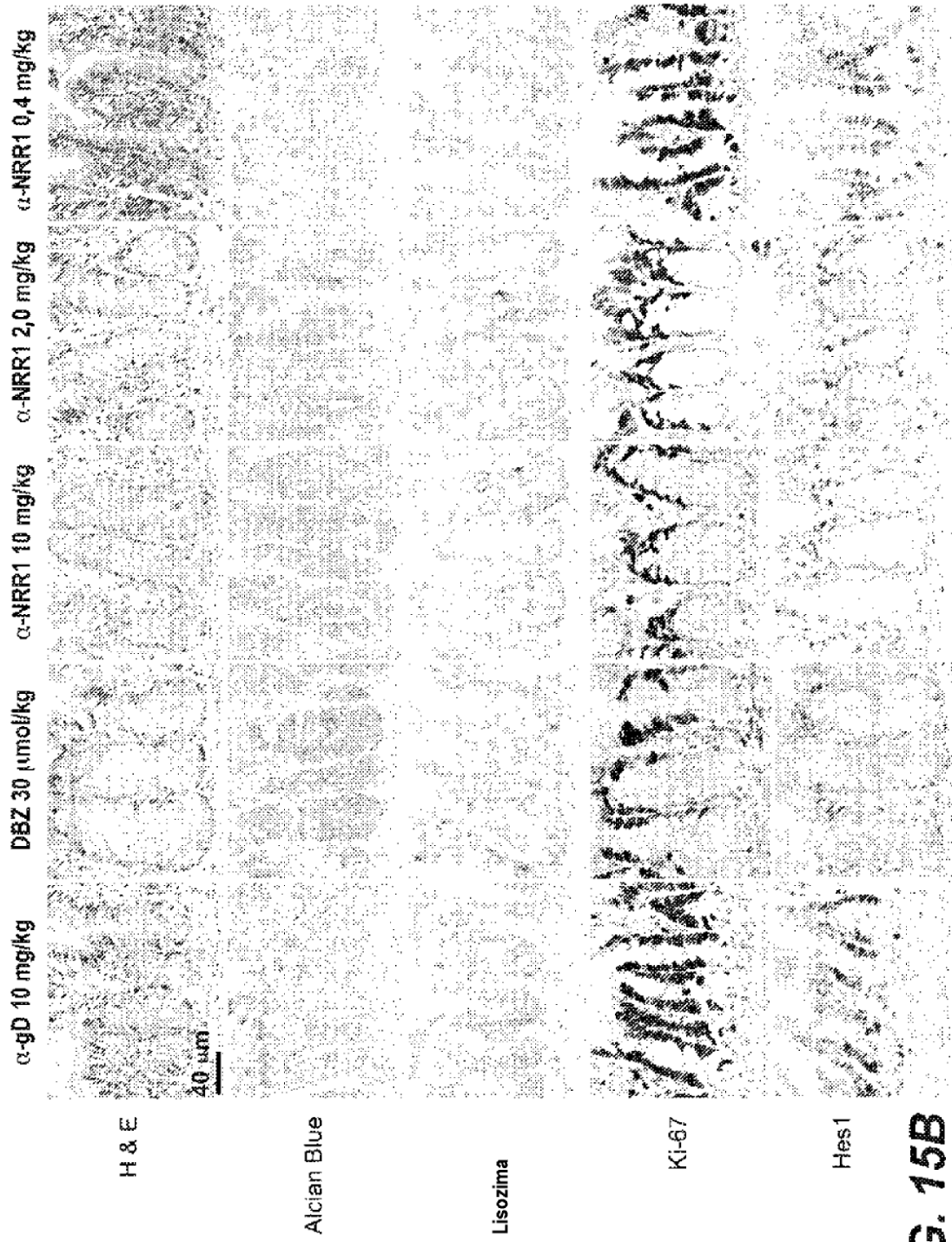
**FIG. 14E**



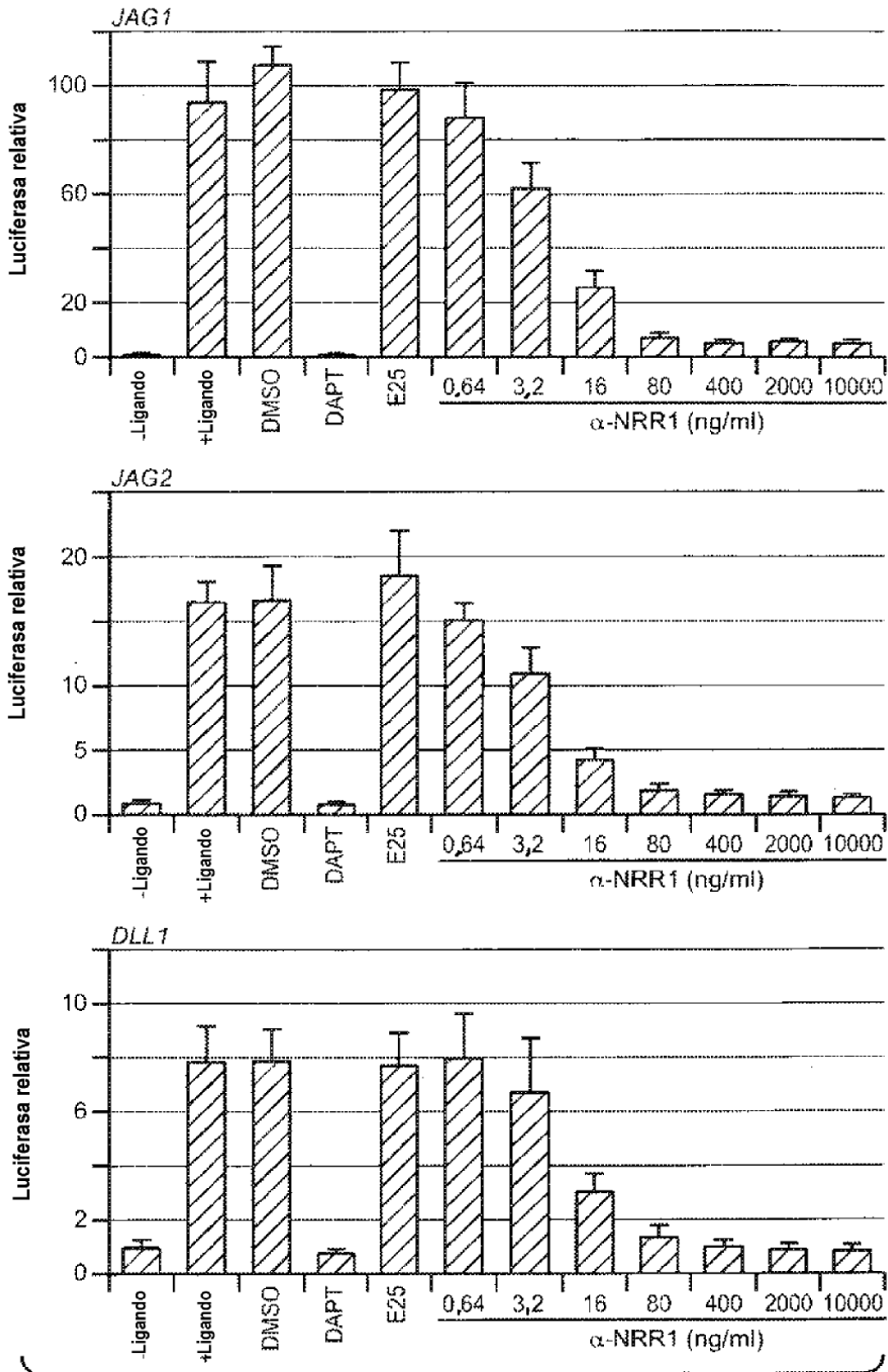
**FIG. 15A**












**FIG. 15C**



**FIG. 15B**

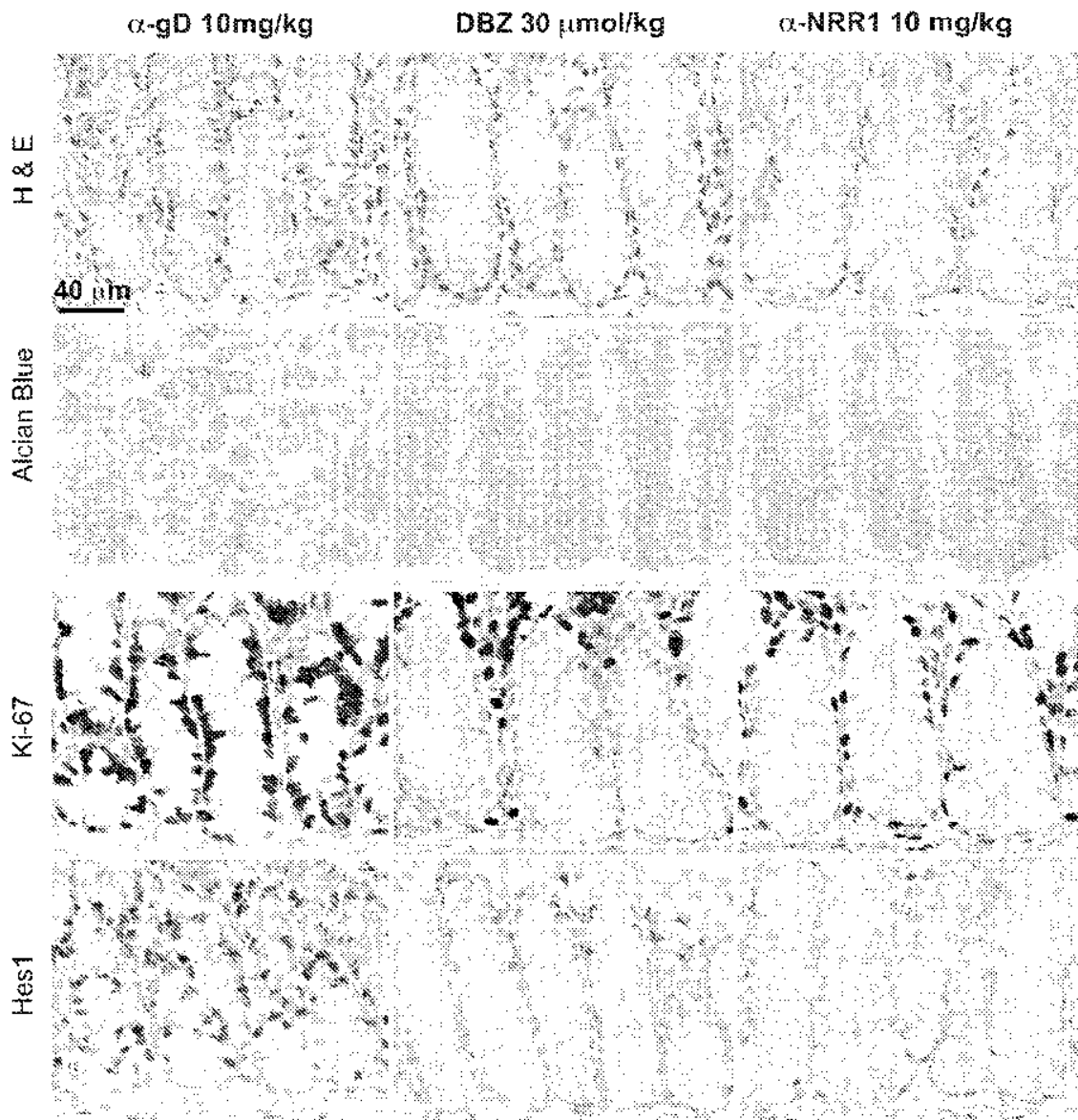


**FIG. 16**

Proteína AP quimérica	Expresión AP	Se une a $\alpha$ -NRR1	Se une a $\alpha$ -NRR2
 AC.Hd	N	---	---
 ABC.Hn	W	N	N
 Hn	N	---	---
 C.Hd	W	N	N
 ABC	W	W	N
 A.Hc	W	W	N
 A.Hd	W	W	N
 AC.Hn	W	N	N
 AC	W	N	N

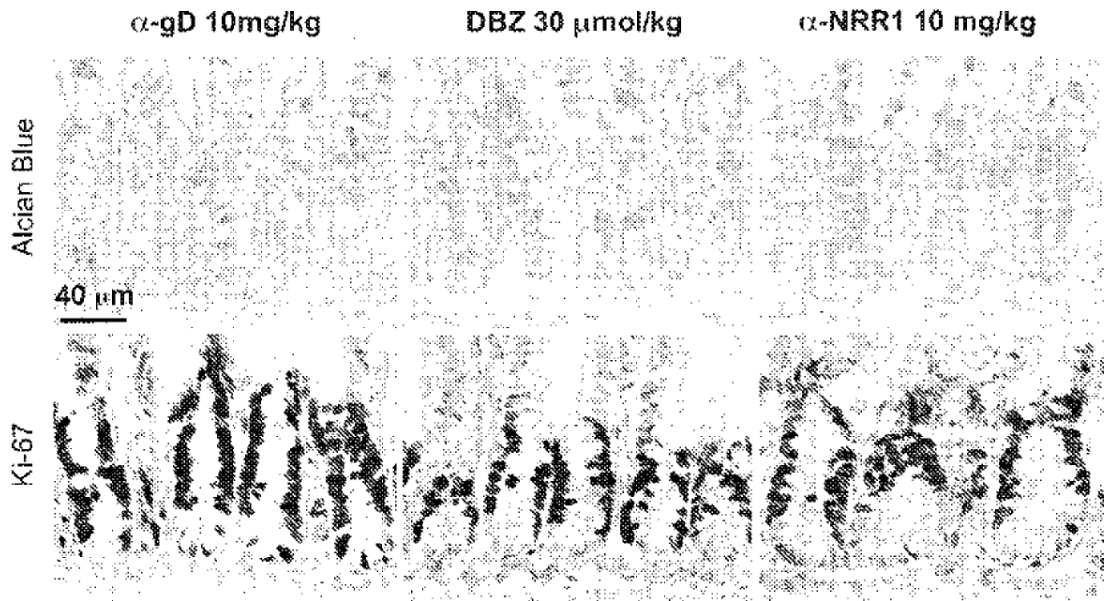
**FIG. 17**



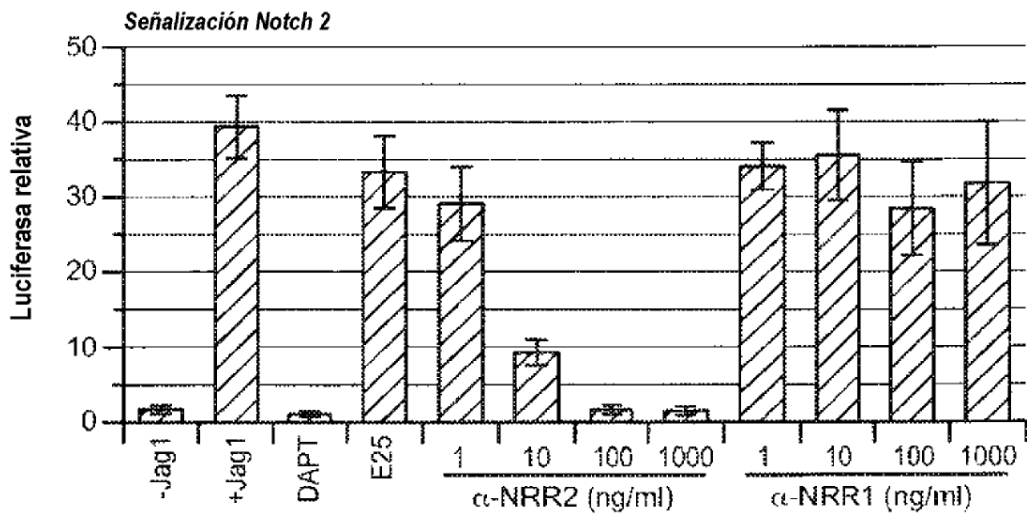


**FIG. 19**

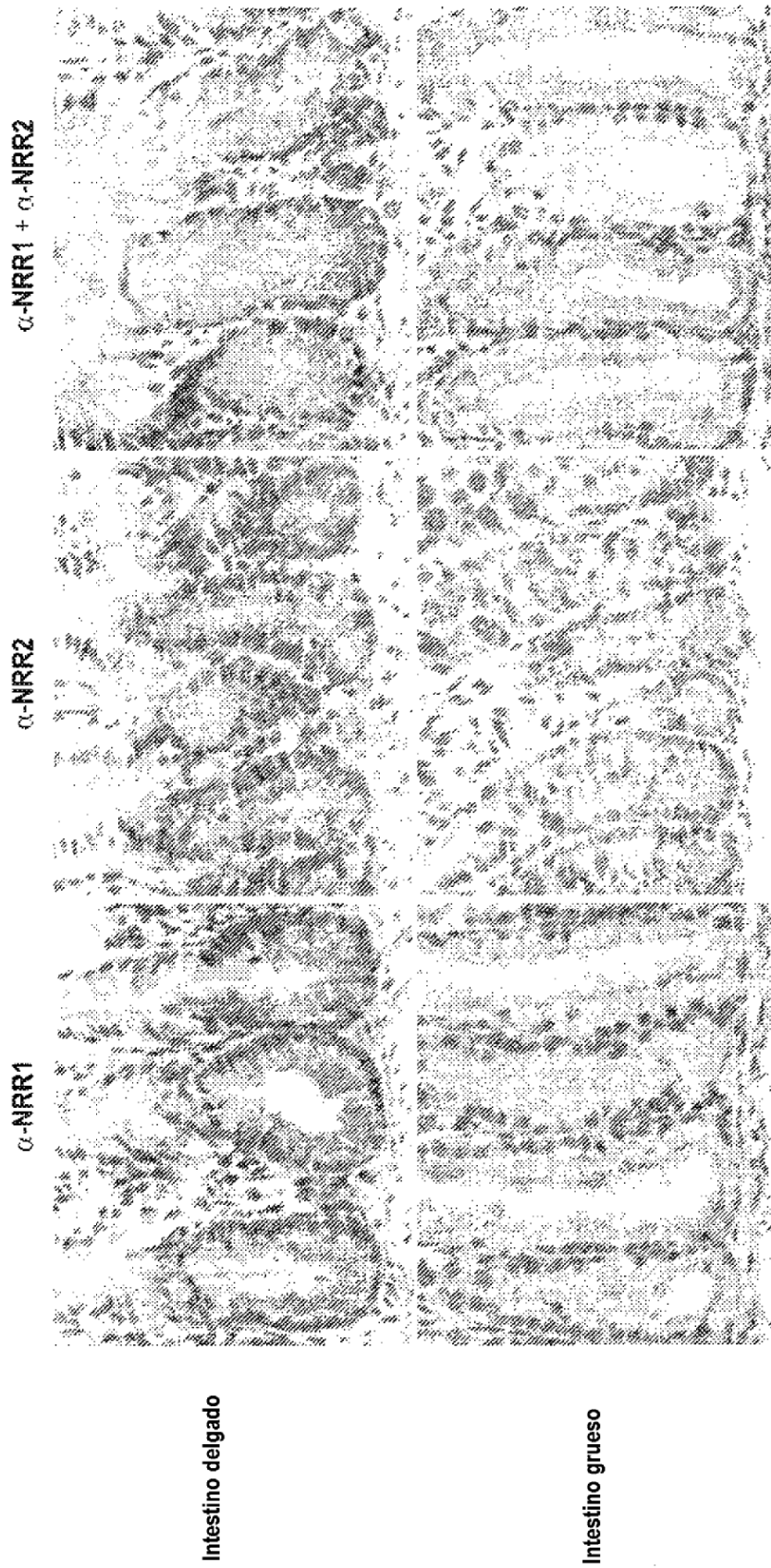




**FIG. 20**



**FIG. 21**



**FIG. 22**

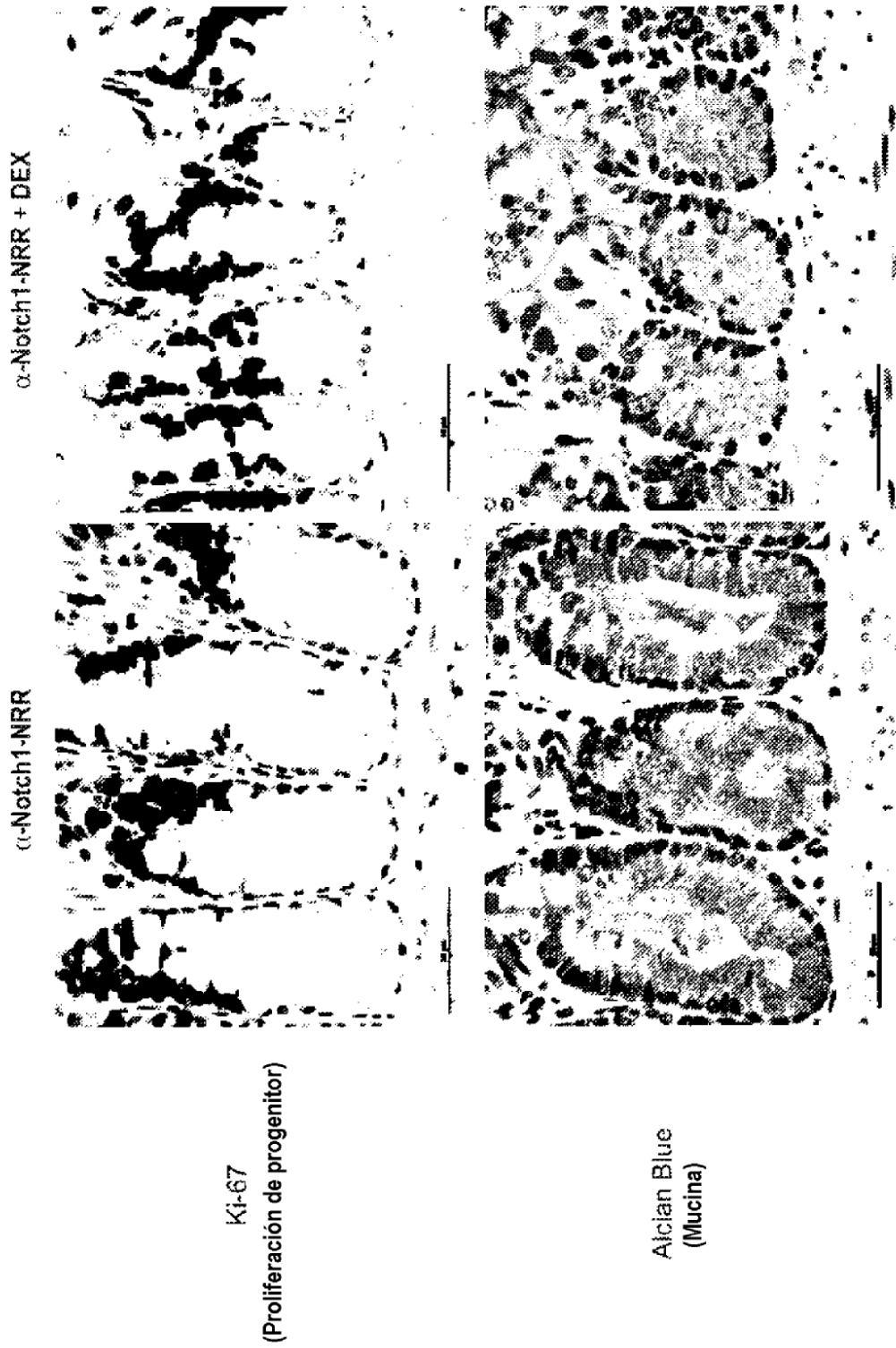
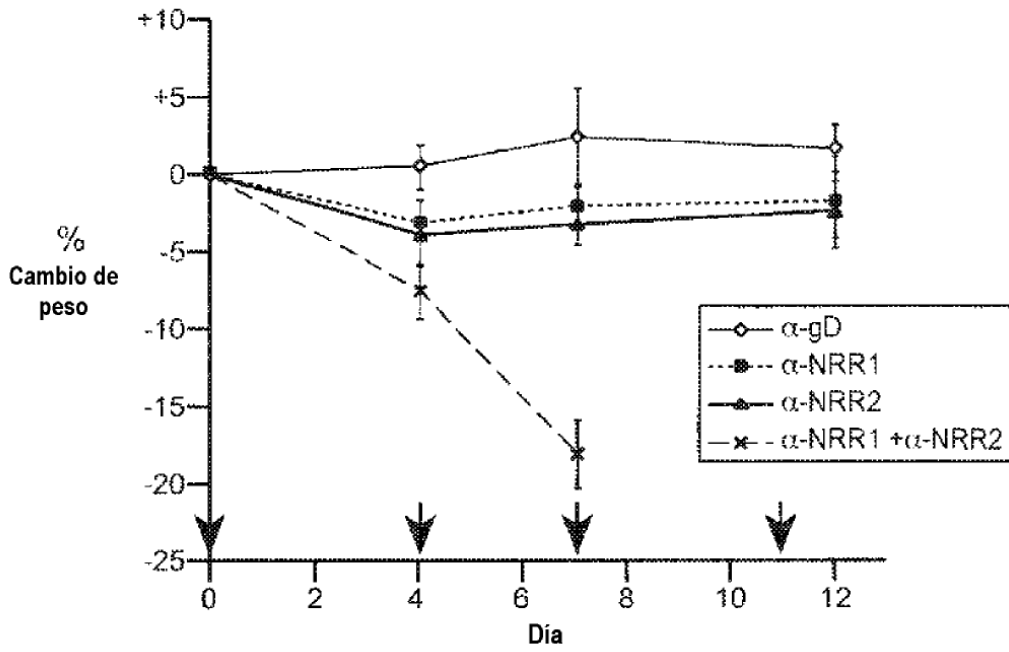
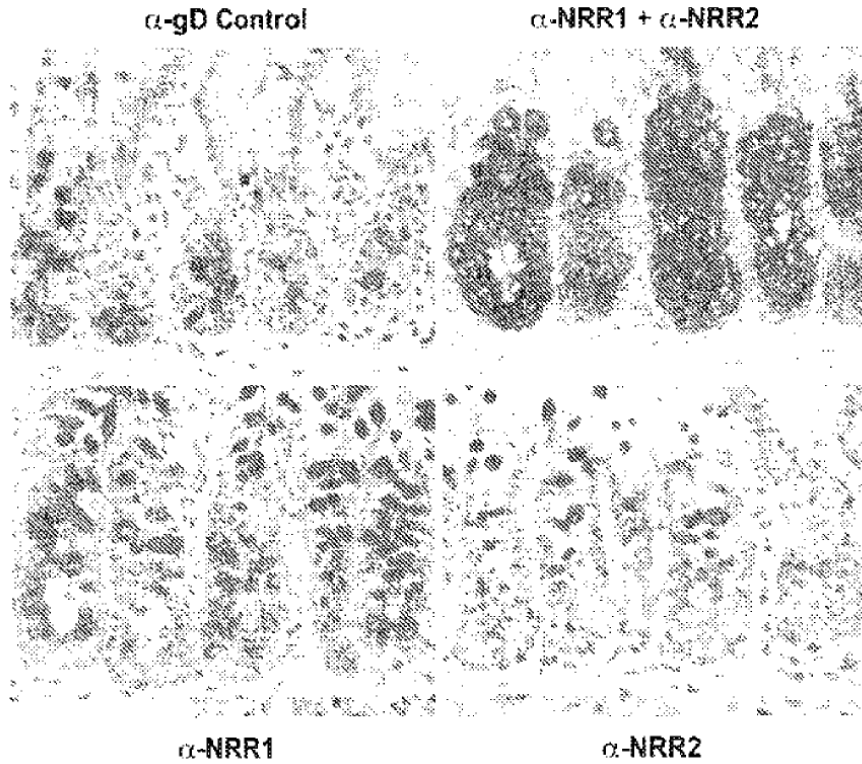


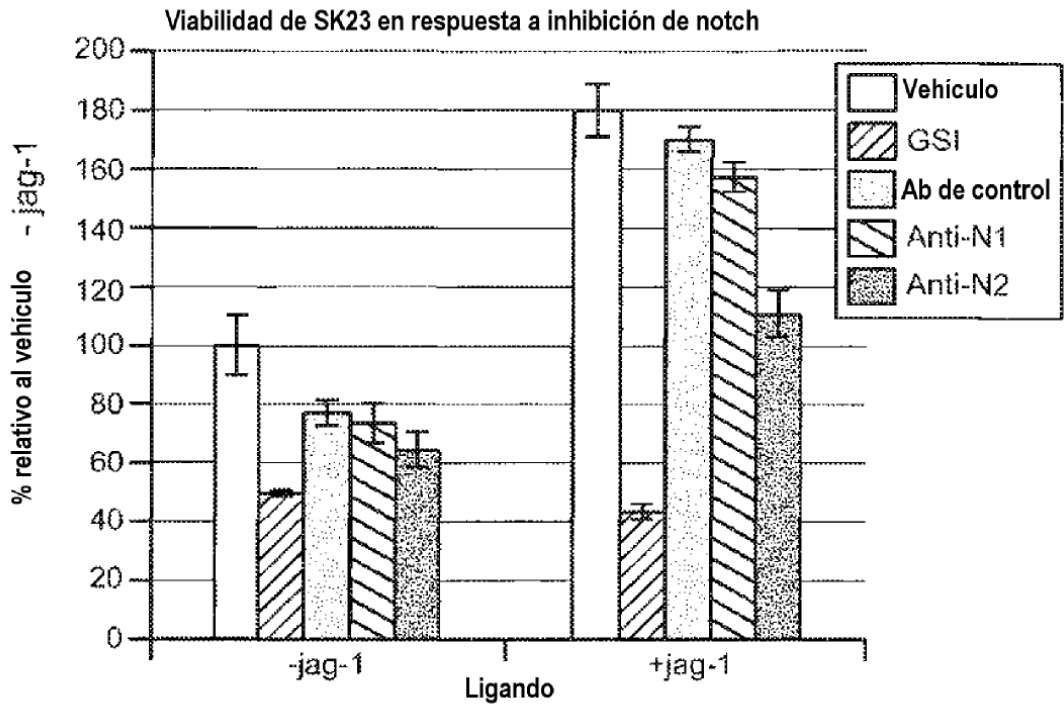
FIG. 23



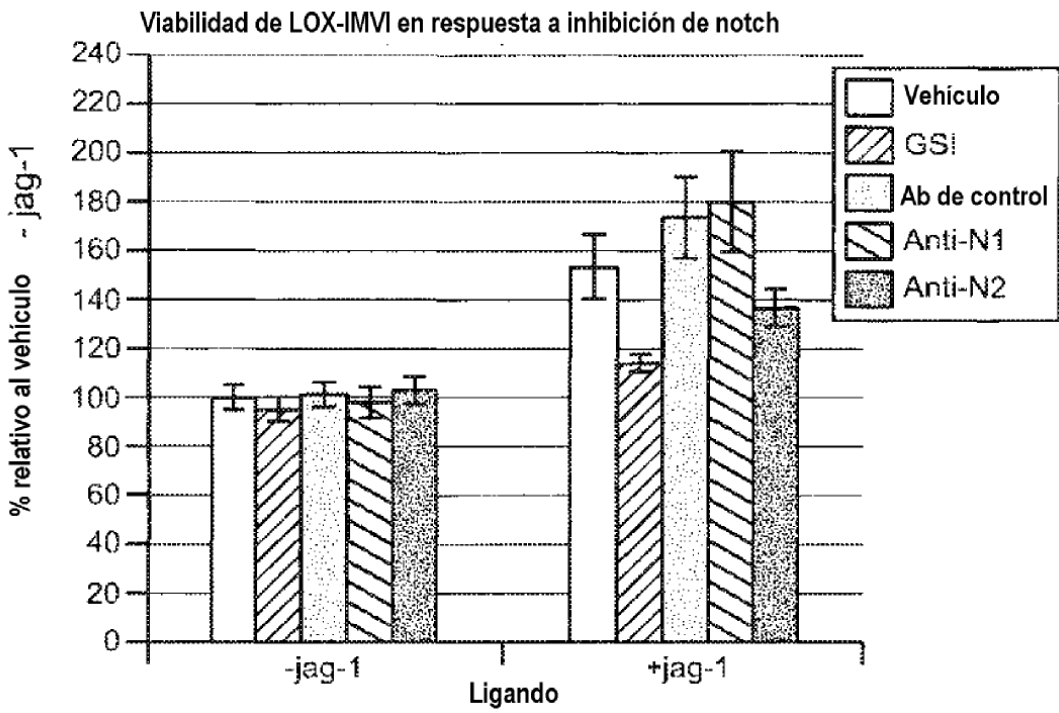
**FIG. 24A**



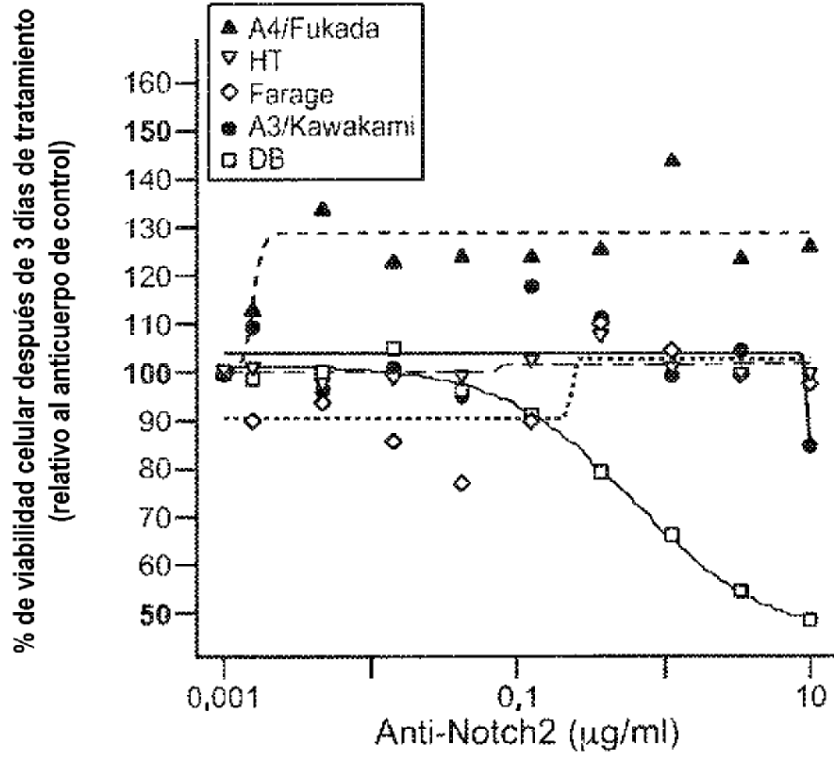
**FIG. 24B**



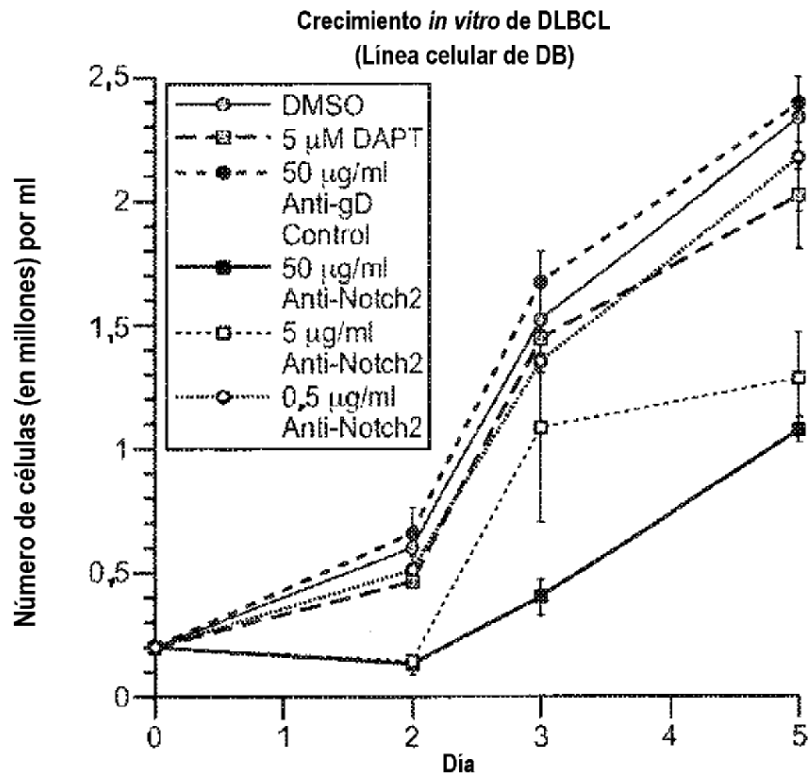
**FIG. 25A**



**FIG. 25B**



**FIG. 26**



**FIG. 27**